

# **Die Rolle der Mastzelle im zytokinen Netzwerk der Haut**

Habilitationsschrift  
Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

Zellbiologie und Histologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Frau Dr. rer. nat. Pia Welker  
geb. am 30.05.1960 in Teuchern

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Datum der Einreichung: Dezember 2002

Datum der Habilitation: 23. Oktober 2003

1. Gutachter: Prof. J. Westermann
2. Gutachter: Prof. T. Luger

## **Zusammenfassung**

Mastzellen sind ubiquitär im Bindegewebe vorkommende Zellen, welche eine Vielzahl von Mediatoren physiologischer und pathologischer Prozesse exprimieren. Ihre Zahl ist in gesunden Geweben gering, am höchsten jedoch in der Haut und Schleimhäuten von Nase, Auge und Gastrointestinaltrakt sowie in der Lunge. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass unter pathologischen Bedingungen, insbesondere bei entzündlichen Reaktionen und Erkrankungen des atopischen Formenkreises, die Mastzellzahlen um ein Vielfaches steigen. Dabei werden die Vorläuferzellen des Blutes, welche aus einer CD34<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarkes rekrutiert werden, aktiviert und durch chemotaktisch wirkende Faktoren zur Einwanderung in die Gewebe stimuliert. Unter Verwendung von in vitro Kulturmodellen konnte gezeigt werden, dass diese Vorläuferzellen im Blut die Expression von c-Kit und CD34 herunterregulieren und als Zellpool im peripheren Blut zirkulieren. Nach Aktivierung der Zellen wurde c-Kit wieder nachgewiesen. Die Zellen wandern ins Gewebe ein und differenzieren dort unter Einfluss von Zytokinen, welche durch andere Gewebszellen freigesetzt werden, aus. Es wurden Wechselwirkungen in der Haut zwischen Mastzellen und Fibroblasten, Melanozyten, Keratinozyten und Nervenzellen gezeigt. Als Mittler dieser Wechselwirkungen konnten, neben den in der Literatur beschriebenen Faktoren, von uns SCF, GM-CSF, NGF und andere Neurotrophine zum Beispiel BDNF, NT-3 und NT-4 gezeigt werden. Die Regulation und Freisetzung dieser Faktoren ist bei pathologisch veränderter Haut, wie bei Atopischer Dermatitis, Psoriasis, Haarwachstumsstörungen, Tumoren der Haut und in der Wundheilung verändert. Die Modulation der Expression dieser Faktoren und ihrer Rezeptoren durch verschiedene Therapeutika, wie Glukokortikoide, Antihistaminika, Retinoide und UV-Bestrahlung konnte in verschiedenen Kulturmodellen gezeigt werden. Diese Erkenntnisse können in Zukunft bei der Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen der Haut, Lunge sowie Darm und, da in zunehmendem Maße auch von Mastzellfunktionen in anderen Organen, wie Hirn, Herz, Leber und Niere berichtet wird, auch hier weiterführend beitragen.

## Abkürzungsverzeichnis

APAAP	Alkaline Phosphatase anti-Alkaline Phosphatase
AD	Atopische Dermatitis
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CAE	Chloracetatesterase
CBMC	Cord Blood derived Mast Cells
CD	Cluster of differentiation
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glia cell Derived Neurotrophic Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
FcεRI	Hochaffiner IgE Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum
HKS	Human Keratinocyte culture Supernatant
HMC	Human Mast Cell
HS	Horse Serum
IL	Interleukin
NGF	Nerve Growth Factor
NT	Neurotrophin
LCS	L-Cell-fibroblast-Culture-Supernatant
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
PBMC	Peripheral Blood derived Mast Cells
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
SCF	Stem Cell Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TR	Transforming Growth Factor Receptor
Trk	Tyrosine Kinase

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung
  2. Charakterisierung der Mastzellvorläuferzellen und deren Differenzierung in der Haut
  3. Einfluss von Zytokinen verschiedener Zelltypen der Haut auf Differenzierung und Funktionen der Mastzelle:
    - 3.1. Wirkung von aus Hautfibroblasten freigesetzten Faktoren:
      - 3.1.1. Stem Cell Factor
      - 3.1.2. Nerve Growth Factor
      - 3.1.3. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
      - 3.1.4. Weitere von Fibroblasten produzierte Faktoren
    - 3.2. Melanozyten als Quelle des Mastzellwachstumsfaktors SCF
    - 3.3. Wechselwirkungen von Keratinozyten und Mastzellen
    - 3.4. Der Einfluss weiterer Zelltypen der Haut auf die Differenzierung und Funktion von Mastzellen
    - 3.5. Wechselwirkungen zwischen Nerven und Mastzellen in der Haut
  4. Die Mastzelle als Quelle von Zytokinen
  5. Modulation der Mediatorfreisetzung als Angriffspunkt für Therapien von chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen
- Literaturverzeichnis

## **Diese Arbeit beinhaltet die Ergebnisse folgender Publikationen**

(Zitierung in der Arbeit mit folgenden römischen Ziffern:)

- I. Welker P, Grabbe J, Zuberbier T, Guhl S, Henz BM (2000) Mast cells and myeloid marker expression during early in vitro mast cell differentiation from human peripheral mononuclear cells. *J Invest Dermatol* 114:44-50.
- II. Grabbe J, Welker P, Dippel E, Czarnetzki BM (1994) Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch Dermatol Res* 287:78-84.
- III. Grabbe J, Welker P, Grützkau A, Dippel E, Nürnberg W, Zuberbier T, Henz BM (1998) Induction of maturation in the immature human mast cell line HMC-1 by fibroblast supernatants, but not by stem cell factor. *Scand J Immunol* 47: 324-31.
- IV. Welker P, Grabbe J, Grützkau A, Henz BM (1998) Effects of NGF and other fibroblast-derived growth factors on immature human mast cells (HMC-1). *Immunology* 94:310-317.
- V. Welker P, Grabbe J, Gibbs B, Zuberbier T, Henz BM (2000) NGF induces mast cell marker expression during in vitro culture of human umbilical cord blood cells. *Immunology* 99:418-426.
- VI. Welker P, Schadendorf D, Artuc M, Grabbe J, Henz BM (2000) Expression of SCF splice variants in human melanocytes and melanoma cell lines - potential prognostic implications. *Brit J Cancer* 82: 1453-58.
- VII. Grabbe J, Welker P, Rosenbach T, Nürnberg W, Krüger-Krasagakes S, Artuc M, Czarnetzki BM (1996) Release of stem cell factor (SCF) from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cells. *J Invest Dermatol* 107:219-224.

- VIII. Welker P, Grabbe J, Zuberbier T, Grützkau A, Henz BM (2001) GM-CSF downmodulates c-kit, Fc(epsilon)RI(alpha) and GM-CSF receptor expression as well as histamine and tryptase levels in cultured human mast cells. Arch Dermatol Res 293:249-58.
  
- IX. Hermes B, Welker P, Feldmann-Böddeker I, Grabbe J, Zuberbier T, Henz BM (2001) Expression of mast cell growth modulating or chemotactic factors and their receptors in human scars. J Invest Dermatol 116: 387-93
  
- X. Henz BM, Hermes B, Welker P: Interactions between neurotrophins and mast cells. In Mast cells and basophils. Marone G, Lichtenstein L, Galli S (eds). Academic Press, San Diego, 2000, pp341-354.
  
- XI. Botchkarev VA, Welker P Botschkarewa NV, Paus R (1998) A new role for neurotrophin-3: involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). Am J Pathol. 1998 153:785-99.
  
- XII. Grabbe J, Welker P, Möller A, Dippel D, Ashman L, Czarnetzki BM (1994) Comparative cytokine release from human monocytes, monocyte-derived immature mast cells, and a human mast cell line (HMC-1). J Invest Dermatol 103:504-508.
  
- XIII. Welker P, Grabbe J, Gibbs B, Zuberbier J, Henz BM (1999) Human mast cells produce and differentially express both soluble and membrane-bound stem cell factor. Scand J Immunol 49:495-501

Weitere eigene Publikationen sind im Literaturverzeichnis mit arabischen Ziffern aufgeführt.

Die eingefügten Abbildungen und Tabellen sind bisher nicht publiziert. Die Methoden sind in den oben genannten Veröffentlichungen beschrieben.

## 1. Einleitung

Mastzellen sind langlebige, aus dem Knochenmark stammende, ubiquitär vorkommende, residente Bindegewebszellen, welche nach neueren Erkenntnissen bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle spielen (1-5, IX-XIII). Unter physiologischen Bedingungen ist ihre Gewebsdichte in den meisten Organen gering, bei pathologischen Veränderungen kann sie jedoch um ein Vielfaches (bis 50-facher Anstieg) zunehmen (6, 7, IX-XI) (Abb. 1).

Die höchsten Mastzellzahlen findet man in der Haut, in den Schleimhäuten von Nase, Auge und Gastrointestinaltrakt, sowie in den Alveolarwänden der Lunge (8). In den letzten Jahren werden aber auch immer neue Erkenntnisse zu funktionellen Einflüssen von Mastzellen in weiteren Organen beschrieben, wie u.a. in Leber, Herz, Niere und Hirn (9-13). In all diesen Organen spielen sie besonders bei der Initiierung und Fortführung entzündlicher und immunologischer Reaktionen, neoplastischer Geschehen, fibrotischer Prozesse sowie beim Gewebeumbau eine Schlüsselrolle (2, VI, IX-XI). Nach Stimulation mit spezifischen Antigenen, Anaphylatoxinen wie C5a, aber auch neurogen wirkenden Substanzen wie Substanz P, und diversen anderen Molekülen reagieren sie mit der schnellen Freisetzung von Mediatoren mit u.a. vasoaktiven und proentzündlichen Eigenschaften (14-15, XII).

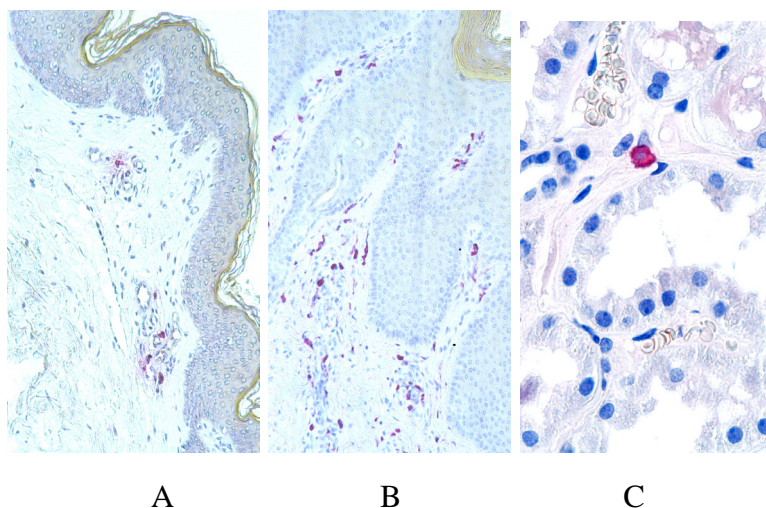


Abb. 1: Immunhistochemische Färbung (APAAP) (I, IX) unter Verwendung eines tryptasespezifischen Antikörpers (AA1) von Biopsien: A- Normalhaut, B – Patient mit Atopischer Dermatitis, C- Niere

Eine Mastzellbeteiligung wurde für eine Vielzahl von Erkrankungen beschrieben. Neben atopischen Erkrankungen, wie der Atopische Dermatitis, dem allergischen Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis/Konjunktivitis, werden stark erhöhte Mastzellzahlen bei chronischer Glomerulonephritis in der Niere, bei Arteriosklerose, Multipler Sklerose im Hirn und in der Umgebung von Tumoren in verschiedensten Organen gefunden (16-21, VI).

Sie weisen jedoch eine ausgeprägte spezie- und gewebeabhängige Heterogenität auf. Dies zeigt sich nicht nur in der je nach Lokalisation sehr variablen Gewebedichte, sondern auch in ihrer Rezeptorexpression und der entsprechenden Stimulationsfähigkeit, sowie im Spektrum der von ihnen gespeicherten oder de novo synthetisierten Mediatoren (22-23, IX-XIII).

Die Zellen entstehen aus hämatopoetischen, CD34+/c-Kit+ Stammzellen des Knochenmarks, zirkulieren in noch wenig charakterisierter Form innerhalb der mononukleären Fraktion des peripheren Blutes (I), und wandern von dort ins Gewebe, wo sie unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren reifen und sehr lange, wahrscheinlich mehrere Monate überleben (24-27). Eine Vermehrung von reifen Mastzellen im Gewebe durch Proliferation wurde bisher auch in pathologischen Prozessen mit stark erhöhten Mastzellzahlen nicht überzeugend gezeigt (28).

Beim Menschen wurde bisher der Stammzellfaktor (SCF), auch Steel Faktor, Mastzellwachstumsfaktor oder c-Kit-Ligand genannt, als wichtigster Proliferations- und Differenzierungsfaktor für humane Mastzellvorläufer identifiziert (II, 29). Den Rezeptor für SCF (c-Kit, oder CD117), eine Tyrosinkinase vom Typ III, welcher durch das Protoonkogen c-kit kodiert ist, exprimieren außer Mastzellen nur sehr wenige Zelltypen, wie hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark und Melanozyten in der Haut (II).

Bei Mastzellen der Maus oder der Ratte konnten dem SCF vergleichbare Funktionen auch für IL-3 und NGF nachgewiesen werden (30, 31). Beim Menschen wurde NGF hingegen bis vor kurzem nur als Wachstumsfaktor für Basophile oder als Kofaktor für SCF bei der Induktion der Mastzellprotease Chymase beschrieben (24). IL-6 beeinflusst nur die Entwicklung von sehr unreifen Mastzellvorläuferzellen, TGF- $\beta$ , IL-4 und IgE die Expression einzelner Rezeptoren bzw. Mediatoren (33-36). GM-CSF und Interferon- $\gamma$  können je nach Entwicklungsstadium aktivatorische oder inhibitorische Wirkungen auf Differenzierungsvorgänge haben (37-39, VIII) .



Die stark vermehrten Mastzellzahlen in allergisch entzündlichen Prozessen könnten, wenn nicht durch Mastzellproliferation, durch Vermehrung der Vorläuferzellen im Knochenmark, verstärkte Zirkulation im peripheren Blut und/oder vermehrter Einwanderung und Differenzierung im Gewebe verursacht werden. Außerdem wäre auch vorstellbar, dass reife Mastzellen durch den Einfluss von chemotaktischen Faktoren in andere Gewebsregionen einwandern können. Chemotaktische Wirkungen auf Mastzellen wurden für eine Vielzahl von Faktoren gezeigt, wie IL-8, TGF- $\beta$ , RANTES, C3a, C5a und auch SCF (40-44).

Dabei ist, sowohl bei der Einwanderung der Vorläuferzellen durch das Endothel, als auch der möglichen Wanderung von reifen Zellen durch das Gewebe in Interaktion mit der extrazellulären Matrix, eine Änderung der Expression von Adhäsionsmolekülen notwendig. Dabei könnten ICAM1- und -3, CD43 und  $\beta$ -Integrine, welche auf Mastzellen nachgewiesen wurden, eine Rolle spielen (45).

Letztendlich könnten auch veränderte Apoptoseprozesse eine Zunahme von Mastzellen unter pathologischen Bedingungen verursachen (46). Auch hier spielt SCF neben NGF eine entscheidende Rolle. Eine Depletion von SCF im Medium von kultivierten reifen Mastzellen führt sehr schnell zur Apoptose von Mastzellen (47). Auch in vivo in der befallenen Haut von Patienten mit Mastozytose konnten Hinweise für einen Zusammenhang von SCF-Expression und Mastzellapoptose gefunden werden (48).

Insgesamt geben all diese Untersuchungsergebnisse ein immer genauer werdendes Bild über die Rolle der Mastzelle in der Pathologie vieler Erkrankungen. Dies ermöglichte in den letzten Jahren die Entwicklung moderner Pharmaka und Behandlungsmethoden zum Einsatz insbesondere bei Patienten mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Die Stimulation von Mastzellen kann durch Einsatz von Anti-IgE, welches durch Komplexbildung spezifische Antikörper bindet (49), unterdrückt werden. Die Expression von inflammatorisch wirkenden Zytokinen lässt sich durch Glukokortikoide hemmen (50). Die Wirkung von Mastzellmediatoren wie Histamin und Leukotriene können durch Antihistaminika bzw. Leukotrienrezeptorantagonisten neutralisiert werden (51, 52). Bei Patienten mit Erkrankungen wie Atopischer Dermatitis, Psoriasis oder Mastozytose werden die Mastzellzahlen in der Haut und damit die Symptome durch UV-Bestrahlung deutlich verringert, möglicherweise durch Auslösung von Apoptose in den Mastzellen (53).

In unserer Arbeitsgruppe wurden in den letzten Jahren interessante Forschungsbefunde erhoben, welche ebenfalls Aufschlüsse über Entwicklung und Funktionen der Mastzelle insbesondere in Wechselwirkung mit den verschiedenen anderen Zelltypen der Haut geben. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Eigenschaften der im Blut zirkulierenden Vorläufer und der Reifungsprozesse in der Haut gelegt. Die Untersuchung der Beeinflussung durch und Wirkung auf andere Zelltypen der Haut, wie Fibroblasten, Melanozyten, Keratinozyten, Nervenzellen und Endothelzellen geben einen Einblick in ein höchst komplexes Netzwerk, dessen Verständnis notwendig ist für Modulationen durch Wirkstoffe in pathologischen Situationen. Ziel der Untersuchungen ist die Klärung der Rolle der Zytokine als Mittler der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zellen.

## **2. Charakterisierung der Mastzellvorläuferzellen im Blut und deren Differenzierung in der Haut**

Die Zunahme der Mastzellzahlen bei entzündlichen und neoplastischen Prozessen könnte durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden: 1.) verstärkte Einwanderung von unreifen Vorläuferzellen, 2.) Proliferation reifer Mastzellen, 3.) Einwanderung reifer Gewebszellen zum Entzündungsort, 4.) verminderte Apoptose. Die Entwicklung der Mastzelle aus einer hämatopoetischen Stammzelle zu Vorläuferzellen im peripheren Blut bis zur ausdifferenzierten Gewebszelle wurde in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht (4, 5, 53, I, II). Über die einzelnen Stationen der Entwicklung ist bisher jedoch wenig bekannt.

Beschrieben wurde, dass die Stammzelle im Knochenmark zu finden ist. Sie ist charakterisiert als CD38-, durch eine Expression der Oberflächenmarker CD34, HLADR und die Expression des SCF-Rezeptors c-Kit (54). SCF spielt fast in jeder Phase der Entwicklung für die Mastzelle eine bedeutende Rolle, die Wirkungen sind jedoch in jedem Kompartiment (Knochenmark, peripheres Blut, Gewebe) sehr unterschiedlich (II). Die unreifen Vorläuferzellen treten dann ins periphere Blut, zirkulieren dort bis sie durch chemotaktisch wirkende Faktoren zum Einwandern ins Gewebe stimuliert werden. Diese Zelle ist CD34 negativ und c-Kit positiv.

Wir haben verschiedene in vitro Kultursysteme mit Zellen in verschiedenen Reifungsstadien zum Studium dieser Zellen entwickelt: 1. Kultur von Zellen aus dem Knochenmark (55) als unreifste Zellen (Bone marrow derived mast cells: BMMC), 2. Kultur von Zellen aus dem Nabelschnurblut (Cord blood derived mast cells: CBMC) (V), welche etwas weiter differenziert sind, aber viele CD34+ Vorläuferzellen enthalten, 3. Kultur von Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut (Peripheral blood derived mast cells: PBMC) (I), mit minimalen Zahlen an CD34+ Zellen, 4. Kultur von unreifen Mastzelllinien (HMC-1/KU-812) (II, IV, VIII, XII), 5. Kultur von isolierten, hochgereinigten Mastzellen aus dem Gewebe.

Das Reifestadium ist an der Dauer der Kultur zu erkennen, welche nötig ist, um bestimmte Mastzellcharakteristika nachzuweisen. Tryptase, als relativ früher Marker des Mastzelldifferenzierungsprozesses ist bei BMMC nach vier Wochen, bei CBMC nach zwei Wochen, bei PBMC nach einer Woche nachzuweisen, in HMC-1-Zellen ganz niedrig exprimiert schon vorhanden (II,IV,VIII,XII). Sowohl die Stammzelle im

Knochenmark, als auch die reife Mastzelle im Gewebe, Anfangs- und Endpunkt der Entwicklung, sind charakterisiert worden (54, 55).

Über die Zellen im Blut ist sehr wenig bekannt. In dem von uns etablierten Modell (I, XII, XIII) konnte gezeigt werden, dass die Zellen der mononukleären Zellfraktion, welche an Kulturplatten adhären, nach zwei Wochen Inkubation mit SCF oder Zellkulturüberständen von Fibroblasten oder Keratinozyten Mastzellcharakteristika entwickeln (I). Diese Fraktion enthält zum großen Teil Zellen, welche CD14, CD64 und CD68 exprimieren, Marker welche als Charakteristika für Monozyten beschrieben sind. Sie sind negativ für CD1, CD33, c-Kit (ein geringes Signal auf mRNA-Ebene ist nachweisbar) und mastzellspezifische Tryptase. Nach zwei Wochen Kultur konnte auf 14-43 % der Zellen der c-Kit Rezeptor nachgewiesen werden, auch CD33, CD64, CD11b und CD68 und die Mastzellmarker Tryptase und hochaffiner funktionell aktiver IgE Rezeptor FcεRIα sind exprimiert. CD34+ Zellen waren zu Beginn der Kultur in sehr geringen Zahlen (<0,1 %), am Ende nicht mehr nachweisbar. Eine Zeitkinetik zeigt eine Reihenfolge der Nachweisbarkeit der Mastzellmarker, wie sie auch in den anderen später beschriebenen in vitro-Kulturmodellen nachgewiesen werden konnten, zuerst die Hochregulation von c-Kit, nach einer Woche war Tryptaseaktivität nachweisbar und nach zwei Wochen der FcεRIα (I).

Unsere Daten zeigen, dass Mastzellen sich aus c-Kit und Tryptase negativen Zellen entwickeln können, welche sich in der adhärenen Fraktion des peripheren Blutes befinden. Sie exprimieren ähnliche Oberflächenmarker wie Monozyten/Makrophagen. Da sie am Beginn der Kultur kein c-Kit exprimieren, ist eine Hochregulation durch andere Faktoren möglich. Diese könnten durch weitere in der Kultur vorhandene Zellen, wie Lymphozyten (ca. 10%), oder nach Aktivierung dieser Zellen durch die Mastzellvorläufer selbst, freigesetzt werden. Dafür spricht, dass eine Kultur von hochaufgereinigten CD14 Zellen (>98 %) mit SCF keine Differenzierung Richtung Mastzelle zeigt.

Aus diese Ergebnissen lässt sich ein Bild des Ablaufes der Entwicklung der Mastzelle entwerfen: unter physiologischen Umständen, also in einem steady-state-Zustand proliferieren die c-Kit+/CD34+ Vorläuferzellen im Knochenmark, treten in das periphere Blut über, verlieren dort CD34 und c-Kit, um als Vorläuferzellpool bereit zu stehen. Eine Expression von c-Kit ist nicht sinnvoll, da die Zellen sonst durch Chemotaxis ausgelöst von SCF ins Gewebe eintreten würden. Da die

Mastzellen im Gewebe sehr langlebig sind, wandern so im steady-state nur sehr wenige Zellen ein. In pathologischen Situationen wird c-Kit auf den Vorläuferzellen im Blut hochreguliert. Bei atopischen Patienten konnte eine höhere c-Kit Expressionen demonstriert werden, die Zellen treten vermehrt ins Gewebe ein und differenzieren dort durch die von den anderen aktivierten Zellen freigesetzten Zytokine.

### **3. Einfluss von Zytokinen verschiedener Zelltypen der Haut auf Differenzierung und Funktionen der Mastzelle**

#### **3.1. Wirkung von aus Hautfibroblasten freigesetzten Faktoren**

Fibroblasten sind direkte Nachbarzellen der Mastzellen im Bindegewebe. Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Zelltypen sind schon seit vielen Jahren bekannt (57). Nachdem zunächst nach Ko-Kulturen von diesen beiden Zelltypen (Mastvorläufer auf Fibroblasten feeder layer) und Kulturen mit Zellüberständen (58, I, III, IV, XII)) eine Mastzelldifferenzierung beschrieben wurde, sind in den letzten Jahren viele Zytokine identifiziert wurden, welche die Reifung der ins Gewebe eingetretenen Vorläuferzelle bewirken bzw. deren Funktion beeinflussen.

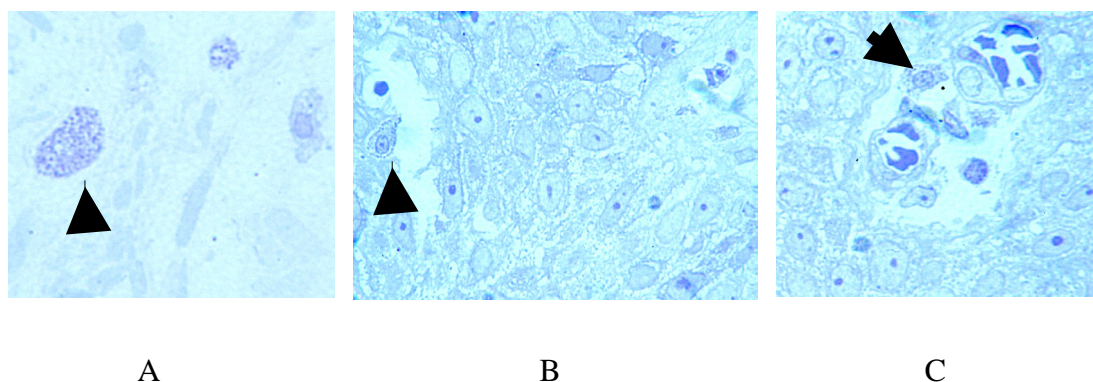


Abb. 2: A: Mastzellen und Fibroblasten im dermalen Bindegewebe, B; C: Mastzellen in der Epidermis. Semidünnschnitt einer Biopsie von einem Patienten mit Atopischer Dermatitis (während Mastzellen in Normalhaut fast ausschließlich im dermalen Bindegewebe lokalisiert sind, findet man sie bei einigen Patienten mit Atopischer Dermatitis und Psoriasis auch in der Epidermis: eigene unveröffentlichte Ergebnisse) Färbung mit Alcianblau

### 3.1.1. *Stem Cell Factor (SCF)*

Als einer der wichtigsten Faktoren für Mastzellen wurde in Kulturüberständen Stem Cell Factor (SCF) identifiziert (II). Er wird außer von Fibroblasten u.a. auch von Hepatozyten, Keratinozyten, Stromazellen, einigen Tumorzellen, Endothelzellen, Langerhanszellen, Melanozyten und Mastzellen selbst produziert (II, VI, XIII). Die biologischen Funktionen des SCF werden über das Protein des c-kit Protoonkogen, einer membrangebundenen Tyrosinkinase mit strukturellen Homologien zu den Rezeptoren von PDGF, CSF-1 und FGF (59, 60) vermittelt. Dieser Rezeptor wird in der Haut nur von Mastzellen und Melanozyten exprimiert, jedoch auch von Epithelzellen, Spermatogonien, CD34+ Knochenmarksstammzellen und verschiedenen Tumorzellen (II).

SCF spielt fast in jeder Phase der Entwicklung und auch in vielen Funktionen der Mastzelle eine Rolle. Je nach Kompartiment in Synergismus mit verschiedenen weiteren Faktoren (61) und je nach Expression der Rezeptoren auf der Zelle, welche wiederum durch das unmittelbare Umfeld der Zelle beeinflusst werden, hat SCF sehr unterschiedliche Wirkungen.

Im Knochenmark finden die frühesten Schritte der Haematopoese statt. Hier bewirkt SCF hauptsächlich eine Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen. Als Einzelfaktor sind jedoch nur hohe Dosen biologisch wirksam (5). In Kombination mit koloniestimulierenden Faktoren wie GM-CSF, M-CSF, G-CSF, EPO und Zytokinen wie IL-3, IL-6, IL11 und NGF wird der proliferative Effekt erhöht, nicht jedoch die Reife dieser Stammzellen beeinflusst (62, 63). Darüberhinaus kann SCF reversibel die Expression von CD34+, dem Marker für die hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen (64). Aus dem Knochenmark tritt die Zelle in die Zirkulation im peripheren Blut über. Dabei wird die Expression von c-Kit (I) und CD34+ herunterreguliert und Adhäsionsprozesse gefördert (65, 66). Auch diese Prozesse werden von SCF beeinflusst, hier u.a. in Kombination mit dem Stromal-Derived Factor (SDF)1(67).

Im peripheren Blut sind die Mastzellvorläuferzellen c-Kit negativ, so dass hier SCF zunächst auf die Zellen wenig Einfluss hat. Werden in pathologischen Situationen c-Kit stimulierende Faktoren freigesetzt, in entzündlichen Reaktionen z.B. durch bestimmte Lymphozyten-Populationen, kann aus den betroffenen Geweben freigesetzter SCF chemotaktisch auf den Vorläuferzellpool wirken und diese ins

Gewebe locken. Die Ergebnisse der in vitro Kulturexperimente lassen diesen Ablauf vermuten (I-V). In einer Kultur von hochreinen CD14<sup>+</sup> Zellen mit SCF wurde keine Entwicklung in Richtung Mastzelle nachgewiesen.

In dem etablierten Modell der Kultur von Vorläuferzellen aus dem Blut konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Kultur dieser Zellen mit SCF allein in serumfreiem Medium kaum eine Hochregulation von c-Kit und gar keine Mastzelldifferenzierung auslösen kann (II). Die Kombination von SCF mit Serum (am besten geeignet Pferdeserum) und Kulturüberständen von Fibroblasten in der Kultur dagegen reguliert die Expression von c-Kit hoch und löst in Folge davon eine Entwicklung der Zellen Richtung Mastzelle aus (I, XII). Dies kann durch eine direkte Wirkung von anderen Zytokinen, welche in Fibroblastenüberständen enthalten sind, ausgelöst werden. Pferdeserum, welches als guter Zellstimulus bekannt ist, kann die in der Kultur enthaltenen Lymphozyten stimulieren, welche dann die Expression des c-Kit-Rezeptors hochregulieren. Auch könnten die Mastzellvorläuferzellen, ebenfalls stimuliert durch die Lymphozyten oder das Serum, autokrin Differenzierungsfaktoren freisetzen.

Die c-Kit positive Mastzellvorläuferzelle kann nun durch das in den Geweben durch verschiedene Zellen (Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen) produzierte SCF in das Gewebe gelockt werden (68), was auch in vivo gezeigt werden konnte (69), wobei weitere Chemokinrezeptoren hochreguliert werden (70).

Hier reifen die Zellen aus und verbleiben als residente Zellen im Bindegewebe. Beide Prozesse werden durch SCF beeinflusst (I, 71).

Die Funktionen der Mastzelle im Bindegewebe, wie Freisetzung von Zytokinen und anderen Mastzellmediatoren wie Histamin, werden ebenfalls durch SCF moduliert, je nach Mastzelltyp und Herkunft direkt oder indirekt nach Präinkubation durch Regulation von Rezeptorexpression (II, IX, 72-74). Durch eine Injektion von SCF in Ratten konnte in vivo gezeigt werden, dass eine c-Kit abhängige Aktivierung der Mastzellen erfolgt, welche eine Entzündungsreaktion auslöst. (75).

Auch der letzte Schritt im biologischen Programm einer Mastzelle, der Zelltod, wird durch SCF reguliert (76). Dabei verhindert SCF Mastzellapoptose. Schon ein kurzzeitiger Entzug von SCF (5-6 Stunden) leitet die Signalkaskade ein, welche im Absterben der Zelle endet (61). Dies hat in der Pathologie verschiedener Hauterkrankungen und auch einigen physiologischen Prozessen eine große Bedeutung. So wurde in unserer Arbeitsgruppe in Patienten mit Urtikaria

pigmentosa, eine Erkrankung mit stark erhöhten Mastzellzahlen vor allem in der Haut, eine gain-of-function Mutation im c-Kit nachgewiesen (77). Diese bewirkt eine ständige Aktivierung des c-Kit Rezeptors, was über die verschiedenen biologischen Wirkungen von SCF, u.a. Schutz vor Apoptose, zu einer Akkumulation der Mastzellen in der Haut und bei systemischen Erkrankungen auch in anderen Organen führt (77). In der Wundheilung bzw. Narbenbildung (IX) konnte eine erhöhte Expression des SCF-Proteins und, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt, auch eine erhöhte Zahl der Mastzellen gezeigt werden.

Es ist zu vermuten, dass SCF auch in anderen mastzellassozierten Erkrankungen (z.B. in Tumorerkrankungen ,VI) eine Rolle spielt.

### 3.1.2. *Nerve Growth Factor (NGF)*

SCF ist jedoch nicht der einzige Faktor, welcher von Fibroblasten freigesetzt wird und auf Mastzellen wirkt. Dies ist ein Ergebnis aus einer Untersuchung, in welcher die HMC-1 Zelllinie mit Fibroblastenüberständen kultiviert wurde. Nach 10 Tagen Kultur konnte eine deutliche Entwicklung von Mastzellcharakteristika in den ansonsten sehr unreifen Mastzellen nachgewiesen werden (III). Die Zelllinie, welche von einem Patienten mit einer Mastzelleukämie etabliert wurde, hat jedoch, wie bei den Patienten mit Urtikaria pigmentosa nachgewiesen, eine gain-of-function Mutation im c-Kit, so dass nicht SCF die Differenzierung Richtung Mastzelle bewirkt haben kann (79, III). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Kulturen mit Überständen von Keratinozyten (80). Die Untersuchung der biologisch wirksamen Fraktionen (Chromatographische Fraktionierung) von Fibroblastenüberständen nach Kandidaten (III), welche sowohl von Fibroblasten als auch Keratinozyten produziert werden, rückte den Nerve Growth Factor (NGF) in den weiteren Mittelpunkt unserer Untersuchungen. Dieser Faktor erschien auch deshalb interessant, weil er ein Verbindungsglied sein könnte, welches die neurogene Komponente vieler mastzellassoziierter Erkrankungen, wie Atopische Dermatitis und Psoriasis, durch Vermittlung der Interaktionen zwischen Mastzellen und Nervenzellen erklärt (81, 82).

NGF, ursprünglich beschrieben als Überlebens- und Differenzierungsfaktor für Neurone (83), wird außer von verschiedenen Zelltypen des Nervensystems und der Haut (84-87) auch von Mastzellen synthetisiert, gespeichert und nach Stimulation



freigesetzt (88-90). Es wurde beobachtet, dass Zellkulturüberstände von HMC-1 das Wachstum von sensiblen Ganglien in Kultur stimulieren können und dass dieser Effekt durch einen Antikörper gegen NGF blockiert werden kann (90). NGF könnte somit dafür verantwortlich sein, dass in der Haut von Patienten mit AD als Erkrankung mit stark erhöhten Mastzellzahlen auch eine höhere Dichte von Nervenfasern und eine höhere Zahl von freien Nervenenden nachgewiesen wurde (91).

Zum Einfluss von NGF in Mäusen- bzw. Ratten wurden verschiedene Studien durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass NGF auf die Entwicklung, Überleben und Funktion von Mastzellen wirkt (92-97).

Wir konnten zeigen, dass das NGF auch im humanen System die Differenzierung und Funktion von Mastzellen beeinflusst. Die Expression vom hochaffinen IgE Rezeptor, Trypase, Chymase und Histamin werden hochreguliert. Dies konnte sowohl für die humane Mastzelllinie HMC-1 (IV), als auch im in vitro-Kulturmodell mit Zellen aus dem Nabelschnurblut (CBMC) (V) demonstriert werden. Die Expression des hochaffinen NGF Rezeptors TrkA konnte auf allen Vorläuferzellen, HMC-1 und Mastzellen gezeigt werden. Der NGFR p75, welcher hauptsächlich auf Nervenzellen exprimiert ist, konnte in PBMC und Mastzellen, in den anderen Zellen nur sehr schwach auf mRNA-Ebene gezeigt werden (IV, V, 98)

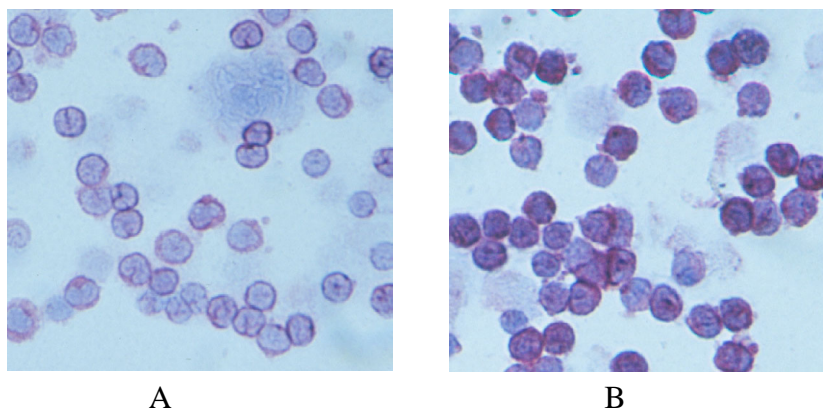


Abb. 3: Immunhistochemische Färbung (APPAP) (I, IX) von PBMC-Zellen (Zytospin, I) unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen TrkA. Zellen isoliert aus dem peripheren Blut eines Normalspenders (A) oder eines Patienten mit Atopischer Dermatitis

Dieses in vitro Kulturmodell wurde im Vergleich zur Literatur insoweit verändert, als wir wie bei den PBMC nur mit den adhärenen Zellen der mononukleären Fraktion gearbeitet haben. Kultiviert man die gesamte Fraktion, dauert es ca. 8-10 Wochen bis als später Marker Chymase exprimiert wird, in unserem System ist sie nach 5-6 Wochen nachweisbar (V). Parallele Ergebnisse sind im PBMC-Kulturmodell zu beobachten. Auch hier kann man zwar die Gesamtfraktion kultivieren, um die Zellen Richtung Mastzelle zu differenzieren. Dieser Prozess dauert dann aber viel länger. In den adhärenen Fraktionen sind die Vorläuferzellen schon weiter Richtung Mastzelle differenziert.

Im Nabelschnurblut kann man viele noch CD34 und zum Teil c-Kit positive Vorläuferzellen finden (99). Die Zahl dieser Vorläuferzellen ist in der nichtadhärenen Phase höher als in der adhärenen mit den weiter entwickelten dann CD34 negativen Vorläuferzellen.

Interessanterweise fanden sich Unterschiede im Nabelschnurblut von Kindern deren Eltern eine Erkrankung des atopischen Formenkreises haben. Diese positive Familienanamnese erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sie selbst eine atopische Erkrankung bekommen, im Vergleich zu Kindern mit nichtatopischen Eltern (99). Die adhärenen Nabelschnurzellen von Kindern mit atopischer Familienanamnese exprimieren mehr SCF und c-Kit und auch schon den hochaffinen IgE Rezeptor, als einen frühen Marker der Differenzierung Richtung Mastzelle (99). Diese Kinder scheinen somit mehr schon weiter entwickelte Mastzellvorläuferzellen im Nabelschnurblut zu haben. Das ist deshalb relevant, weil viele Kinder mit atopischer Diathese schon in den ersten Lebensmonaten an Atopischer Dermatitis erkranken. In späterem Alter bekommen diese Kinder dann oft allergisches Asthma (Kleinkind-Schulkindalter) oder allergische Konjunktivitis (Pubertätsalter). Ist eine hohes Risiko für diese „Karriere“ schon zum Zeitpunkt der Geburt bekannt, können einige protektive Maßnahmen (längeres Stillen, Vermeiden bestimmter Allergene) möglichst intensiv durchgeführt werden.

In unserem in vitro Kulturmodell der Nabelschnurzellen konnten wir zeigen, dass NGF fast mit gleicher Wirksamkeit wie SCF die Differenzierung Richtung Mastzelle initiiert (V). Eine Kombination beider Faktoren beschleunigt diese Prozesse noch. Auch hier konnten, wie bei der Kultur der PBMC oder HMC-1, in einer ganz definierten Reihenfolge die Mastzellcharakteristika nachgewiesen werden: c-Kit, FcεRIα, Tryptase, Chymase (V).

Diese Ergebnisse zeigen, dass NGF ebenso wie SCF Mastzelldifferenzierung stimulieren kann. Für die Relevanz dieser Ergebnisse sprechen *in vivo* Untersuchungen. Abb. 4 zeigt eine deutliche Hochregulation von NGF-Rezeptoren in der Haut von Patienten mit einer Atopischen Dermatitis, welche mit stark erhöhten Mastzellzahlen einhergehen (Siehe auch Abb.1) Auch NGF selbst ist bei diesen Patienten hochreguliert (hier nicht gezeigt). P75 (Abb. 4D) ist besonders stark in Nervenfasern exprimiert. Da NGF auch von Mastzellen selber freigesetzt wird (88), könnte NGF ein wichtiger Mittler zwischen Mastzellen und Nerven besonders in chronischen Erkrankungen mit neurogener Komponente sein.

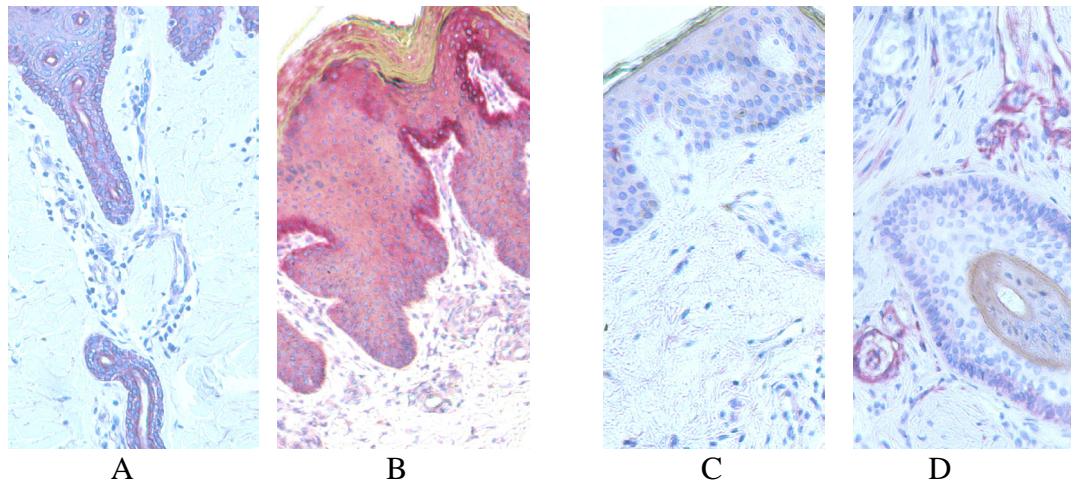


Abb. 4: Immunhistochemische Färbung (APAAP, I, IX) von Schnitten aus Hautbiopsien von Normalpersonen (A, C) und Patienten mit Atopischer Dermatitis (B, D) unter Verwendung von Antikörpern spezifisch für TrkA (A, B) und p75 (C, D).

### 3.1.3. Granulozyten-Makrophagen Coloniestimulierender Faktor (GM-CSF)

GM-CSF wurde ebenso wie NGF in unseren Fibroblastenüberständen, welche SCF-unabhängige Mastzelldifferenzierung auf HMC-1 Zellen verursachten, nachgewiesen und wird außer von Fibroblasten auch von Keratinozyten produziert. Er wurde deshalb ebenso als Kandidat für die Regulation der Mastzelldifferenzierung in den zur Verfügung stehenden *in vitro* Modellen untersucht (VIII, 100).

GM-CSF ist als Proliferations- und Wachstumsfaktor für hämatopoetische Stammzellen und sehr frühe Vorläuferzellen bekannt (101, 102). In etwas reiferen Zellen wurden in der Literatur inhibierende Effekte beschrieben, so im Maussystem auf Zellen aus dem Knochenmark und auf Mastzellen, welche aus Leberstammzellen generiert wurden (103, 104).

Es konnte gezeigt werden, dass GM-CSF in allen Kulturmodellen, unter verschiedenen Kulturbedingungen (Kultur mit Fibroblastenüberständen, SCF oder NGF) dosis- und zeitabhängig die Differenzierung hemmt. Alle untersuchten Mastzellcharakteristika wurden entweder in geringerem Maße herunterreguliert (c-Kit, Histamin, Tryptase) oder die Expression war vollständig unterdrückt (FcεRIα) (VIII, 100). Dieser Effekt wird durch einen neutralisierenden GM-CSF Antikörper aufgehoben. Die Expression des GM-CSF Rezeptor wird mit fortschreitender Differenzierung herunterreguliert und auch der Ligand selber hemmt die Expression (VIII).

Diese Ergebnisse lassen sich jedoch nur begrenzt auf in vivo Verhältnisse anwenden. Bei einer Patientin mit systemischer Urtikaria pigmentosa konnte zwar eine Hemmung der Differenzierung von Mastzellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarkes mit GM-CSF in vitro gezeigt werden. Die subkutanen Injektionen von GM-CSF hemmten zunächst (für vier Wochen) auch Symptome wie Juckreiz. Jedoch kam es danach zu einer Leukozytose, welche nach 10 Wochen auch die Zahl von Vorläuferzellen in der Haut ansteigen ließ (105). Diese Zellen exprimierten c-Kit (starker Anstieg der Zahl der c-Kit positiven dermalen Zellen), jedoch nur ein Teil von ihnen Tryptase, und nach Abzug der CD1a-positiven Langerhanszellen noch weniger den FcεRIα.

Dies unterstützt zum einen unsere in vitro-Ergebnisse zum Ablauf der Mastzelldifferenzierung nach einem festgeschriebenen Programm, unabhängig vom Kompartiment in dem sie stattfindet. Andererseits zeigt dies auch, dass die unterschiedlichen Effekte von GM-CSF nicht gleichmäßig gewichtet sind. Der proliferationsfördernde Effekt auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen fällt stärker ins Gewicht, als der hemmende auf die Ausdifferenzierung der Zellen. GM-CSF verhindert einerseits die Differenzierung der Zellen in der Haut, dafür nimmt die Zahl der einwandernden unreifen Vorläuferzellen zu. Da auch diese einige funktionell wichtige Mastzellcharakteristika haben (z.B. Expression von Histamin und Zytokinen), kann dies die Symptome der Urtikaria pigmentosa nach einer

zeitweiligen Verbesserung eher verschlechtern (105). Möglicherweise könnte ein anderes Zeitmanagement oder die Kombination mit anderen Therapeutika trotzdem den Einsatz von GM-CSF in der Behandlung der Mastozytose möglich machen. Der in vivo Einsatz von Zytokinen, welche vielfältige und zum Teil je nach Körperkompartiment gegensätzliche Wirkungen haben, bleibt in jedem Falle schwierig.

#### 3.1.4. *Weitere von Fibroblasten produzierte Faktoren*

Außer den bisher beschriebenen Faktoren wurden in unseren in vitro Kultursystemen weitere Faktoren getestet, welche sowohl von Fibroblasten, als auch Keratinozyten produziert werden und von denen schon gewisse biologische Effekte auf myeloische Zellen beschrieben wurden (106). Der Einfluss von TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ), bFGF (basic Fibroblast growth factor) und PDGF (Platelet derived growth factor) auf die Expression von Mastzellcharakteristika ist getestet worden (IV). Auf HMC-1-Zellen konnten keine signifikanten Effekte auf die untersuchten Marker gezeigt werden, außer eine geringe Hochregulation von Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -spezifischer mRNA (bisher nicht veröffentlicht), obwohl die Zellen Rezeptoren für alle untersuchten Faktoren exprimieren. Ein Grund dafür könnte z.B. sein, dass Mastzellen selbst in der Lage sind diese Faktoren in größeren Mengen zu produzieren (107). Eine weitere externe Zugabe wird daher kaum biologische Effekte erzielen können. Ansätze mit inaktivierenden Antikörpern oder Antisense-Proben wären für diese Fragestellung sinnvoll. Aus in vivo Daten können jedenfalls Effekte dieser Faktoren auf Mastzellfunktionen in bestimmten Prozessen wie Haarzykluskontrolle und Wundheilung vermutet werden (108, IX).

#### 3.2. Melanozyten als Quelle des Wachstumsfaktors SCF

Der Rezeptor des Mastzellwachstumsfaktors SCF, c-Kit, wird in der Haut außer von Mastzellen nur noch von Melanozyten exprimiert (II). Auch auf Melanozyten, welche in der Basalmembran der Epidermis zu finden sind, hat der SCF vielfältige biologische Wirkungen: Induktion von Proliferation, Differenzierung, Überleben, Integrinexpression, Migration und Synthese des Melanins (II, 109-110).

Melanozyten, wie Fibroblasten in der Haut sehr eng den Mastzellen benachbart, da diese oft direkt unter der Basalmembran in der Dermis detektiert werden können, sind ebenfalls in der Lage, SCF selbst zu produzieren (VI, 109) und zwar beide Formen von SCF. Lösliches SCF, SCF-1 oder sSCF (soluble SCF), wird freigesetzt durch eine proteolytische Spaltung an der Aminosäure 165 in der Nähe der Transmembrandomäne. Die abgespaltene Form kann dann ihre biologischen Wirkungen auf andere Zellen ausüben. In einer alternativ gesplizierten mRNA fehlt die Sequenz des Exons 6. Dieses Exon codiert genau für die Stelle, welche die proteolytische Spaltstelle enthält. SCF kann deshalb nicht abgespalten werden und bleibt membranständig (SCF-2, mSCF) (II, VI, 112). Beide SCF-Formen haben unterschiedliche biologische Wirkungen auf Melanozyten. Während SCF-1 Funktionen in der Migration von Melanozytenvorläuferzellen haben, wirkt SCF-2 auf Differenzierung und Überleben in der Haut (113).

Auch in verschiedenen malignen Melanomen konnten SCF und c-Kit Expressionen gezeigt werden, wobei diese zunächst schwer mit prognostischer Bedeutung vereinbar waren (114). Wir konnten in einer Studie an 11 verschiedenen Melanomzelllinien in vitro und an einem Tiermodell zeigen, dass nur Zellen, welche sowohl die Fähigkeit verloren haben SCF-2 als auch c-Kit zu exprimieren, metastasieren (VI). Deshalb ist für SCF eine juxtakrine Funktion vorstellbar.

Juxtakrine Faktoren vermitteln sowohl löslich biologische Effekte und interagieren membranständig mit Nachbarzellen, welche den Rezeptor für diesen Faktor exprimieren. Solange noch einer der Oberflächenproteine (c-Kit oder SCF-2) gebildet wird, kann die Zelle im Melanomverband verbleiben, verliert sie beide, fängt sie an zu metastasieren (VI).

Hier ist auch eine Rolle von Mastzellen, in unmittelbarer Nähe zu Melanozyten lokalisiert, vorstellbar, welche sowohl c-Kit als auch SCF-2 exprimieren (XIII). Auf eine Wirkung des Mastzell-SCF auf Melanozyten deutet auch die verstärkte Pigmentierung in Erkrankungen mit erhöhten Mastzellzahlen, wie Mastozytom und Urtikaria Pigmentosa. Zudem wurde gezeigt, dass die Mastzellzahlen in der Umgebung von Melanomen erhöht sind (115). Für eine funktionelle Bedeutung spricht das Symptom Juckreiz, eventuell ausgelöst vom durch Mastzellen ausgeschütteten Histamin, welches als Begleiterscheinung bei Melanomen bekannt ist. Die Melanomzellen könnten selbst, solange sie das lösliche SCF-1 freisetzen, an der Erhöhung der Mastzellzahlen in ihrer Umgebung beteiligt sein, welche dann,

durch Synthese von angiogenen Faktoren wie VEGF (116), Gefäßneubildung im Tumor fördern und damit zur Versorgung des Tumors beitragen können.

Außer dem SCF/c-Kit System gibt es weitere Zytokine, wie z.B. IL-8, welche die biologischen Funktionen von Mastzellen und Melanozyten in Verbindung bringen und in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine Rolle spielen (117).

### 3.3. Wechselwirkungen von Keratinozyten und Mastzellen

Nach Fibroblasten und Melanozyten sind epitheliale Zellen einschließlich der in der Haut vorkommenden Keratinozyten die am nächsten liegenden Nachbarn für die Mastzellen. Keratinozyten sind, wie die Fibroblasten, Quelle vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren (2, 4). Diese können viele physiologische und pathologische Prozesse autokrin beeinflussen, wie epidermale Differenzierung, Wundheilung und Immunabwehr, aber auch direkt oder indirekt auf benachbarte Zellen wirken. Dabei gibt es oft interessante Unterschiede zwischen den undifferenzierteren Keratinozyten in der Nähe der Basalschicht und den differenzierten Zellen in den oberen Schichten, welche Schlussfolgerungen auf biologische Funktionen erlauben.

Unser besonderes Interesse galt zunächst wieder SCF. Es konnte gezeigt werden, dass auch Keratinozyten SCF exprimieren und freisetzen (VII). Um Unterschiede hinsichtlich des Differenzierungsstadiums untersuchen zu können, wurde eine spontan immortalisierte Zelllinie (HaCaT) verwendet, welche noch viele Funktionen normal differenzierender Keratinozyten hat (118). Diese und auch die normalen Keratinozyten exprimieren SCF konstitutiv, die Freisetzung wird jedoch nach Stimulation (Ca-Ionophore) um das 10-fache erhöht. In pathologischen Prozessen, insbesondere bei Entzündung, können diese erhöhten SCF-Konzentrationen die Vorläuferzellen der Mastzellen in die Haut locken, diese sind auch überwiegend unterhalb der Basalschicht oder sogar in direktem Kontakt zu finden. Ein Eindringen in die Epidermis ist nur in sehr seltenen Fällen zu beobachten, wie z.B. bei Atopischer Dermatitis (Abb. 5).

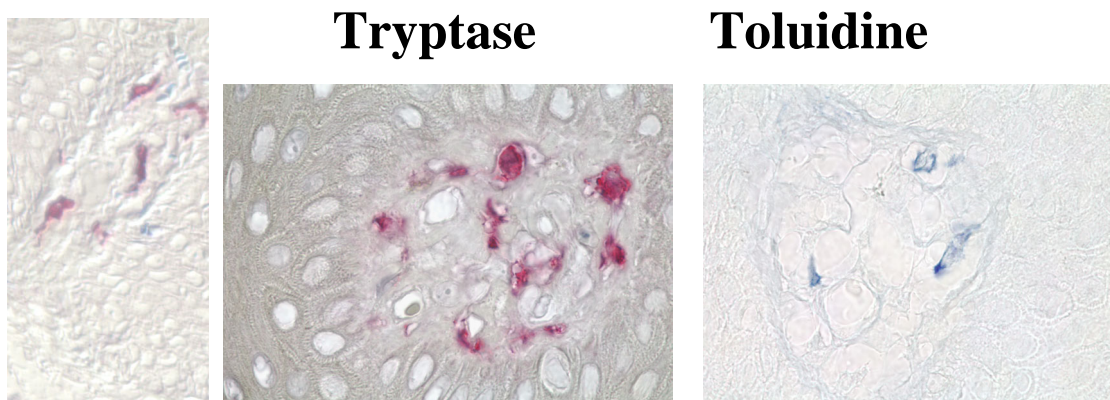


Abb. 5.: Immunhistochemische Färbung (APAAP, I, IX) einer Biopsie von einem Patienten mit Atopischer Dermatitis (epidermale Mastzellen) unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Mastzelltryptase (V, VIII).

Die Proteine der Basalmembranzone, wie z.B. Kollagen IV, bilden normalerweise eine Barriere, durch welche die Mastzellen nicht eindringen können. Bei der Atopischen Dermatitis scheint dies bei einigen Patienten aufgehoben zu sein, möglicherweise durch die Freisetzung und Wirkung der mastzellspezifischen Proteasen in einer veränderten Zusammensetzung (119). Mastzellen exprimieren neben den Serinproteasen Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase auch Matrixmetalloproteasen, welche u.a. Kollagene proteolytisch spalten (119). In der Folge wandern die Mastzellen durch die zerstörte Basalmembran ein. In direktem Kontakt mit den Keratinozyten können sie dann die pathologischen Prozesse weiter beeinflussen und verstärken. Das Einwandern der Mastzellen könnte möglicherweise auch durch eine erhöhte Expression der schon erwähnten SCF-Splice-Variante, des membranständigen SCF, gefördert werden, welche in den differenzierteren Zellen höher exprimiert ist und mit den c-Kit-positiven Zellen als Juxtakrin interagieren könnte.

Eine Modulation des SCF könnte somit ein Therapieansatz sein. Wir konnten zeigen, dass Retinoide und Dexamethason in der Lage sind, SCF-Expression und Freisetzung aus Keratinozyten zu hemmen (120). Eine Wirksamkeit von Glukokortikoiden wie Dexamethason in allergisch-entzündlichen Erkrankungen ist schon länger bekannt, jedoch ist über die Mechanismen bisher wenig bekannt. Die Hemmung der SCF-Expression und Freisetzung könnte ein Funktionsmechanismus sein.

Ebenso wie für die Fibroblasten konnte am Modell der SCF-unabhängigen Differenzierung der HMC-1 Zelllinie auch für die Keratinozyten gezeigt werden, dass



sie außer dem SCF weitere Mastzelldifferenzierungsfaktoren produzieren können (80). Die biologische Wirkung von NGF und TGF- $\beta$  wurde dabei schon bei aus Fibroblasten freigesetzten Faktoren demonstriert (IV, V).

#### 3.4. Der Einfluss weiterer Zelltypen der Haut auf die Differenzierung und Funktion von Mastzellen

Neben Mastzellen spielen auch **Lymphozyten** eine wichtige Rolle bei allergischen und entzündlichen Prozessen. Die Wechselwirkungen sind dabei vielfältig (121). Mastzellen produzieren präformiert und nach Stimulation eine große Zahl von Faktoren, welche einerseits chemotaktisch auf Lymphozyten wirken und deshalb ihr Einwandern aus den Kapillaren in die Gewebe beeinflussen, andererseits die Reifung und Funktion beeinflussen. Mastzellen können u.a. TNF- $\alpha$  präformiert exprimieren und nach Stimulation sofort freisetzen (122). Sie produzieren außerdem Interleukine (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, and IL-16), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Macrophage Inflammatory Proteins (MIP-1, MIP-2) und RANTES, welche bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielen. Da auch diese oft präformiert gespeichert sind (wie z. B. IL-6, IL-8, IL-16) (122, 123) können sie im akuten Prozess unmittelbar ausgeschüttet werden und den Entzündungsprozess in Gang bringen. Von Mastzellen freigesetztes TNF-alpha kann die Expression von IL-3, RANTES und Interferon-gamma in Lymphozyten auslösen, IL-6 T-Zell-Proliferation bewirken und IL-4 Differenzierung von T-Zell-Subpopulationen beeinflussen (121, 124).

Lymphozyten sind ihrerseits in der Lage die Akkumulation und Funktion von Mastzellen zu beeinflussen. In den in vitro Mastzelldifferenzierungsmodellen konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte Mastzellvorläuferkulturen nicht zu reifen Zellen differenzieren, jedoch Kulturen mit einem Anteil an Lymphozyten (I). Von Lymphozyten freigesetzte Faktoren, vorzugsweise im Zell-Zell-Kontakt (124) mit den Vorläuferzellen, können den zunächst nicht exprimierten c-Kit Rezeptor hochregulieren und damit den Prozess der Differenzierung starten.

Weiterhin können von Lymphozyten freigesetzte Zytokine die Funktionen von Mastzellen beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Faktoren direkt Mastzelldegranulation auslösen oder verstärken können. Der direkte Zell-Zell-Kontakt durch heterotypische Aggregation von Mastzellen mit aktivierten, nicht aber

durch nichtaktivierte T-Zellen, über das Adhäsionsmolekülsystem LFA-1/ICAM-1 induziert bzw. verstärkt dabei die IgE-Rezeptorabhängige Degranulation (124).

Mastzellen interagieren im Entzündungsprozess außer mit T- auch mit B-Zellen. Von Mastzellen freigesetztes IL-4 und Mastzellchymase erhöhen die Produktion von IgE aus Plasmazellen (125). Andererseits konnte gezeigt werden, dass IgE die Differenzierung von Mastzellen verstärkt, die Expression des hochaffinen IgE Rezeptors erhöht und die Zellen vor Apoptose schützt (126, 127), was besonders in der Pathogenese von Erkrankungen mit erhöhten IgE-Serumspiegeln, wie der Atopischen Dermatitis oder Psoriasis, von Bedeutung ist.

Ein weiterer Mittler der Wechselwirkungen zwischen Mastzellen und Lymphozyten ist GM-CSF. GM-CSF wird einerseits sowohl von Mastzellen selbst als auch TH1-Lymphozyten produziert und vermittelt andererseits bei beiden Zelltypen über einen spezifischen GM-CSF-Rezeptor verschiedene biologische Effekte (128, 129).

Von Mastzellen freigesetztes GM-CSF kann Lymphozytenvorläuferzellen rekrutieren und ihre Proliferation erhöhen. Auch frühe Mastzellvorläuferzellen im Knochenmark proliferieren unter Einfluss von GM-CSF. Auf spätere Entwicklungsstufen im peripheren Blut und in der Haut hat GM-CSF überwiegend inhibierende Effekte (VIII, 38), die Differenzierung und Mastzellfunktionen werden gehemmt.

GM-CSF wird, wie auch Interferon-Gamma, IL-2 und TNF-alpha von TH1-Zellen freigesetzt, während Th2-Zellen überwiegend IL-4 und IL-5 freisetzen (129-131). TH2-Zellen setzen damit eher mastzellhemmende Faktoren und Th2-Zellen mastzellaktivierende Faktoren frei. Eine Verschiebung des Gleichgewichts der von Th1- und Th2-Lymphozyten freigesetzten Zytokine in Richtung mastzellaktivierender (IL-4) zu Ungunsten mastzellhemmender (GM-CSF, Interferon gamma) Faktoren kann deshalb die Ursache für die Initiierung von atopischen Erkrankungen sein (VIII, 130, 131).

Auch in den frühen Phasen der Wundheilung konnte eine Beteiligung von GM-CSF und seinem Rezeptor parallel zum Anstieg der Zahlen von unreifen Mastzellen gezeigt werden (IX, 78), was für eine Beteiligung der Mastzellen an der Rekrutierung des für die Wundheilung beschriebenen frühen entzündlichen Infiltrates spricht. Für andere mastzellmodulierende Faktoren wie SCF, TGF- $\beta$  und NGF wurden Effekte über den gesamten Prozess der Wundheilung demonstriert (IX). Diese können sowohl Mastzellzahlen, als auch Funktionen modulieren.

Eine wichtige Funktion der Mastzellen in Wechselwirkung mit **Endothelzellen** im Remodelling in der Wundheilung ist die Förderung von angiogenetischen Prozessen. Mastzellen sind in der Haut vermehrt in der Nähe von Endothelien zu finden (Abb. 6). Sie können angiogenesefördernde Faktoren wie VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-8 produzieren (5, 116, 122, 132), Heparin zum Binden an Zelloberflächen und Extrazelluläre Matrix freisetzen, durch Lipidmediatoren mikrovaskuläre Permeabilität induzieren und chemotaktische Wirkstoffe für Angiogenesefaktorfreisetzende Zellen exprimieren. Außerdem ist beschrieben, dass in Kontakt mit Lymphozyten Mastzellen Matrixmetalloproteinasen (u.a. MMP-9) produzieren, welche die Bindegewebsmatrix aufbrechen können und damit die Voraussetzungen für Neoangiogenese schaffen können (133).

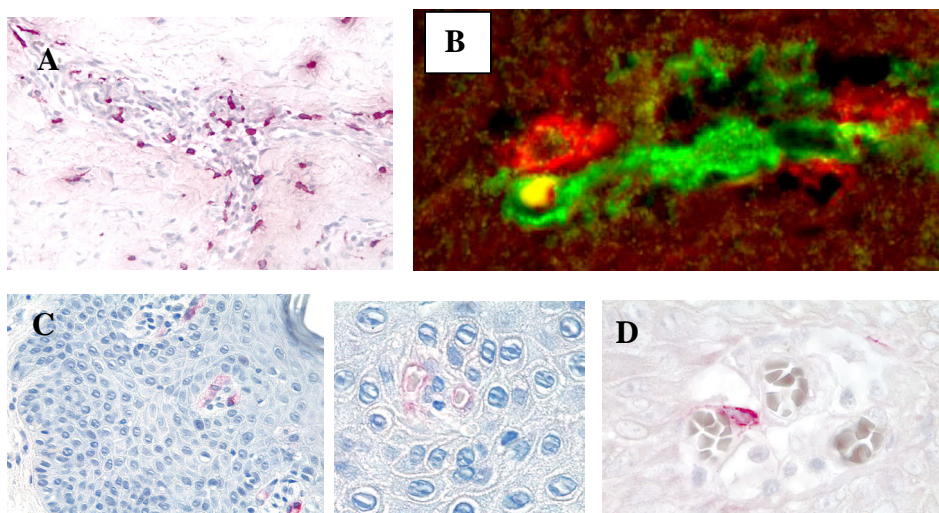


Abb. 6: Immunhistochemische Färbungen (A, C, D – APAAP, I, IX, B Doppelfluoreszenzfärbung mit Cy-2 und Cy-3 und Overlay) von Mastzellen und Endothel. A: Tryptase-positive Mastzellen um Gefäße in der Haut eines Patienten mit Atopischer Dermatitis. B: Endothelmarker CD31(grün) und c-Kit-positive Mastzellen (rot), C: Nachweis von Neoangiogenese durch Färbung CD105 positiver Endothelzellen (Marker für proliferierende Endothelzellen) D: Serienschnitt von C – tryptasepositive Mastzelle in direktem Kontakt mit neugebildeten Endothelien.

In einigen Patienten mit Atopischer Dermatitis konnten neben Mastzellen auch neugebildete Gefäße in direktem Kontakt durch Serienschritte und Doppelmarkierungen (Abb. 6) gezeigt werden. Hier ist auch von Bedeutung, dass Mastzellen durch die Fähigkeit Matrixmetalloproteinasen zu produzieren in der Lage sind, die Basallamina (Hauptbestandteil Kollagen IV) aufzubrechen und somit

Neoangiogenese zu ermöglichen. Außer MMP-9 konnten, neben einer Reihe von weiteren MMPs auch MMP-2 in Mastzellen nachgewiesen werden, beides Enzyme, welche Kollagen IV spalten können (Tab.1, Ergebnisse eines Gene Expression Arrays). Eine Stimulation der Mastzellen erhöht die Expression der meisten MMPs (Tab.1, P2 Signal)

P1	P2	GeneName	AccessionNum	Locus
16,7	22.3	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	NM_002428	16q13-16q21
11,3	14.3	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kD gelatinase, 72kD type IV collagenase)	J03210	16q13-q21
10,2	13.7	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	AW628280	14q11-q12
7,0	10.2	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	U79292	8q21
6,2	7.6	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kD gelatinase, 92kD type IV collagenase)	AX011001	20q11.2-q13.1
5,3	9.2	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	AI189375	22q11.23
4,3	4.8	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	AK024818	11q22.3
4,2	5.0	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	11q22.3
3,9	4.7	matrix metalloproteinase 23B	AI347985	1p36.3
3,7	4.2	matrix metalloproteinase 19	U38320	12q14
3,3	4.3	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	X07819	11q21-q22
2,2	2.5	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	U78045	11q22.2-q22.3
1,9	1.7	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	NM_002427	11q22.3

Tab. 1: Differential Gene Expression Assay der HMC-1 Mastzelllinie (Incyte Genomics and BioCat GmbH, Heidelberg). P1- Zellen unstimuliert, P2 – Zellen stimuliert für 24 h mit PMA, Mittelwert einer Doppelbestimmung, Positives Signal > 2, 0 (Signalintensität der spezifischen mRNA im Verhältnis zur Expression verschiedener Housekeeping Gene)

Der Nachweis von CD105 (Endoglin) als Marker für proliferierende Endothelzellen in direktem Kontakt mit Mastzellen (Abb. 6) zeigt die direkte funktionelle Bedeutung von Mastzellen in der Neoangiogenese. Dies ist nicht nur für die Prozesse der Wundheilung und Gewebsregeneration von Bedeutung. Auch in der Umgebung von Tumoren konnten erhöhte Mastzellzahlen nachgewiesen werden (VI, 134, 135).

### 3.5. Wechselwirkungen zwischen Nerven und Mastzellen in der Haut

Es ist seit längerem bekannt, dass einerseits verschiedene Erkrankungen der Haut, welche mit erhöhten Mastzellzahlen einhergehen wie Atopische Dermatitis (AD) oder Psoriasis, auch durch das Nervensystem beeinflusst werden, zum anderen Mastzellen eine Funktion in vielen neuroinflammatorischen Erkrankungen spielen. Mittler dieser Wechselwirkungen könnten neben verschiedenen Neuropeptiden auch Neurotrophine sein, eine Familie strukturell und funktionell verwandter Polypeptide (X, XI, 98).

Neurotrophine (oder neurotrophe Faktoren) umfassen eine Familie strukturell und funktionell verwandter Polypeptide mit bis zu 50 % Aminosäuresequenzhomologie. Sie induzieren Proliferation und neuronale Differenzierung, beeinflussen synaptische Funktionen und regulieren Mechanismen der Apoptose während der verschiedenen Phasen der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems (deshalb auch Neuropoietine) (136, 137).

Bekannte Neurotrophine sind NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin 3), NT-4, NT-5, NT-6, NT-7, CNTF (ciliary neurotrophic factor), GDNF (glia cell line-derived neurotrophic factor) und LIF (leukemia inhibitory factor) = CNDF (cholinergic differentiation factor). BDNF, NGF und NT-3 werden auch als NGF-Familie bezeichnet (138-140). Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF (epidermal growth factor), HBNGF (heparine-binding neurite-promoting factor), IGF-2 (insuline-like growth factor),  $\alpha$  und  $\beta$  FGF (fibroblast growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), NSE (neuron-specific enolase) und Activin A werden nicht primär als Neurotrophine bezeichnet, können aber neben vielen anderen Funktionen auch neurotrophe Wirkungen haben. Antiproliferative Effekte auf Nervenzellen wurden für NAP (neural antiproliferative protein), Astrostatine und GGIF (glia growth inhibitory factor) beschrieben (136).

Viele dieser Faktoren vermitteln ihre biologischen Aktivitäten über eine Tyrosinspezifische Proteinkinase, welche im *trk*-gene codiert ist (X, XI, 141). Es wurde zunächst gezeigt, dass die meisten dieser Faktoren in Gliazellen oder Neuronen gebildet werden und ihre Funktionen im zentralen und peripheren Nervensystem in zahlreichen Studien belegt (136). In den letzten Jahren gab es aber vermehrt Hinweise, dass diese Faktoren außer in einigen physiologischen Prozessen, wie z.B:

dem Haarzyklus (XI), auch in einer Reihe von allergischen, entzündlichen und in Autoimmunreaktionen eine Rolle spielen (137).

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass verschiedene Erkrankungen der Haut eine neurogene Komponente haben, wie z. b. die AD, für welche auch, die in früheren Jahren umstrittene, Bezeichnung Neurodermitis verwendet wurde (142). Die AD ist eine chronische, mit starkem Juckreiz verbundene, entzündliche Hauterkrankung mit einer ständig steigenden Prävalenz insbesondere unter Kindern. Veröffentlichungen geben an, dass gegenwärtig mehr als 10 % aller Kinder während ihrer Entwicklung an einer AD erkranken (142). Zur Pathogenese gibt es zahlreiche offene Fragen. Ob die AD primär eine allergen-induzierte oder nur eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung ist, kann bis heute nicht klar beantwortet werden.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Neuropeptide, welche durch sensorische Nerven freigesetzt werden wie substance P (SP), NKA und NKB (neurokinine A und B), CGRP (calcitonin gene-related peptide), VIP (vasoactive intestinal peptide) und SOM (somatostatine), direkt oder indirekt die Funktion von Zellen modulieren können, welche an der Pathogenese dieser Hauterkrankung beteiligt sind wie Keratinozyten, Langerhanszellen, Endothelzellen, infiltrierende Immunzellen und Mastzellen (143, 144).

Eine zentrale Rolle spielen dabei die Mastzellen und das durch die Zellen freigesetzte Histamin, ein biogenes Amin, welches eine Vielzahl von Effekten in allergischen und entzündlichen Prozessen in verschiedenen Zelltypen vermittelt, z.B. Kontraktion (Muskel), vasoaktive Wirkungen (Blutgefäße) und Juckreiz (Nervenzellen) (145). Mastzellen treten vermehrt in der Umgebung dieser Zelltypen auf, besonders in der Nähe von Nervenzellen. Es wurde gezeigt, dass sie einen bedeutenden Beitrag zur Entwicklung, Reifung und Degeneration des Nervensystems leisten (146).

Mastzellen stimulieren z.B. Astrozyten durch Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$ , höhere Mengen an zytotoxisch wirkendem NO (Stickstoffmonoxid) zu produzieren und sind somit wahrscheinlich an der Pathogenese chronischer neurodegenerativer bzw. – inflammatorischer Erkrankungen des Nervensystems beteiligt (147). Peritoneale Rattenmastzellen sind in der Lage nach Stimulation mit IgE/anti-IgE Neuronen zu depolarisieren und deren Membranresistenz zu verringern (148). Mastzellspezifische Proteasen wie Tryptase und Chymase können von Nervenzellen gebildete Neuropeptide prozessieren (149).

Eine sehr wichtige Rolle in den Interaktionen zwischen Mastzellen und Nervenzellen spielt NGF (IV, V, X). Einige seiner biologischen Funktionen sind bereits in Kapitel 3.2.1. beschrieben. Der Überlebens- und Differenzierungsfaktor für Neurone wird außer von verschiedenen Zelltypen des Nervensystems und der Haut auch von den Mastzellen synthetisiert, gespeichert und nach Stimulation freigesetzt (90).

Gezeigt werden konnte aber auch, dass Mastzellen selbst Rezeptoren für Neurotrophine exprimieren. Für peritoneale Rattenmastzellen wurde die Expression von TrkA, aber nicht TrkB und C beschrieben (138), während auf der humanen Mastzelllinie HMC-1 und isolierten humanen Lungenmastzellen alle drei Rezeptortypen Trk A, B und C gefunden wurden, jedoch nicht der NGFR p75 (IV, V).

In verschiedenen Maus- bzw. Rattenmodellen, z.B. dem Haarzyklus der Maus, konnte gezeigt werden, dass NGF Entwicklung, Überleben und Funktion von Mastzellen beeinflusst (X). Eine Ko-Kultur von Zellen der Rattenmastzelllinie RBL mit sympathischen Neuronen führt zu einer Reifung der Mastzellen (150). Andere Autoren konnten zeigen, dass in NGF-überexprimierenden Mäusen die Mastzellzahlen deutlich erhöht sind (151).

Die potenzielle Rolle des NGF in der Verhinderung von Apoptose (programmierter Zelltod) wird u.a. mit der autokrinen Stimulierung von Überlebensfaktoren wie IL-3, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  und GM-CSF erklärt (152). In Tiermodellen und klinischen Studien, in denen Neurotrophine wie NGF, BDNF und CNTF als neue Therapeutika für neurodegenerative Erkrankungen getestet wurden, fand man neben verschiedenen anderen Nebenwirkungen auch die Auslösung von Entzündungsprozessen in der Haut (137).

In in-vitro Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Neurotrophine die Histaminfreisetzung aus peritonealen Rattenmastzellen erhöhen (153). Andere Autoren berichten, dass zwar NGF in Ratten einen Einfluss auf Apoptose und Serotoninfreisetzung hat, nicht aber BDNF oder NT-3 (138).

In verschiedenen Studien konnte somit bewiesen werden, dass Mastzell-Nerven-Interaktionen (Neuroimmunologische Achse) sowohl in entzündlichen, immunologischen als auch neurologischen, physiologischen und pathologischen Prozessen von großer Bedeutung sind (IV, V, X, XI, 138, 145, 149). Detaillierte Untersuchungen darüber, welche Faktoren und welche anderen Zelltypen durch indirekte Effekte in diesen cross-talk einbezogen sind, stehen noch aus. Sie sind

wichtig, um daraus Informationen zur Pathogenese von Hauterkrankungen mit neurogener Komponente wie AD einerseits und neuroinflammatorischer Erkrankungen wie Multipler Sklerose andererseits zu erhalten.

#### 4. Die Mastzelle als Quelle von Zytokinen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde schon eine Vielzahl von Faktoren erwähnt, welche von Mastzellen exprimiert und freigesetzt werden können.

Dieses sehr umfangreiche Mediatorspektrum ermöglicht eine Kommunikation mit fast allen Zelltypen und spricht für eine zentrale Rolle der Mastzellen in vielen pathologischen Prozessen der Haut einschließlich der Schleimhäute (154, 155). Abbildung 7 zeigt die Rolle von Mastzellen in der Schleimhaut beim chronisch allergischen Asthma bronchiale.

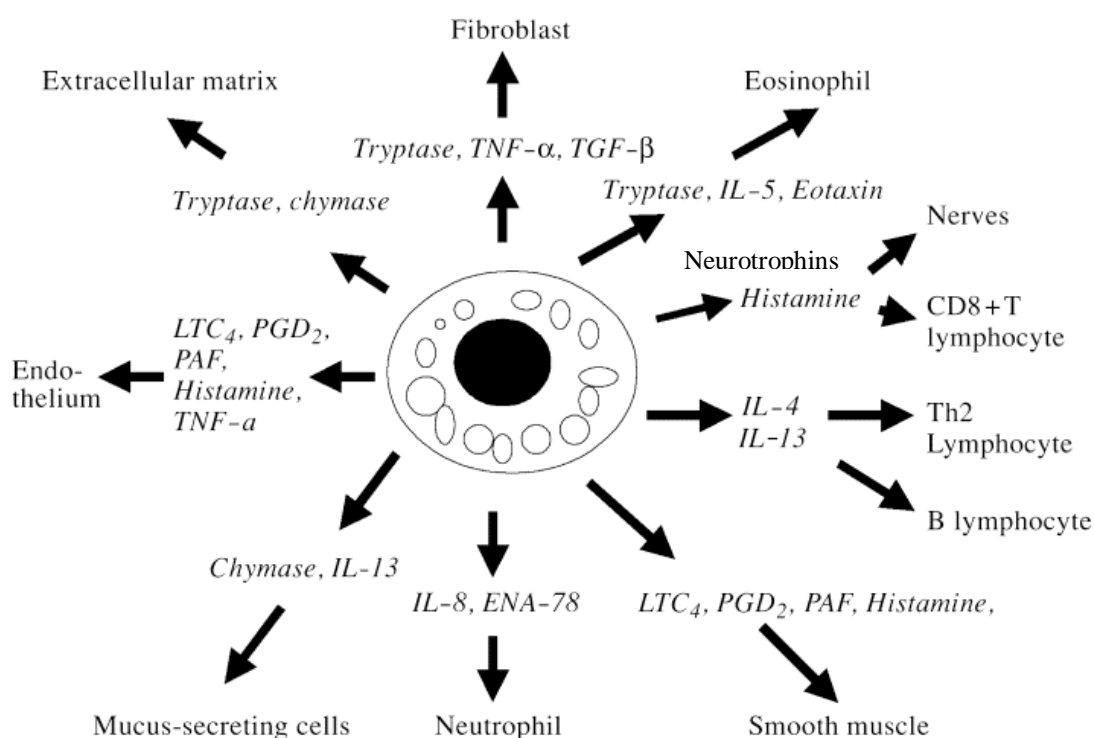


Abb. 7: Die Rolle von Mastzellmediatoren in der Entwicklung von chronisch allergischem Asthma bronchiale (modifiziert nach Hart, 156)

Unterscheiden kann man zwischen Mediatoren, welche durch Degranulation innerhalb von Minuten ausgeschüttet werden und damit eine Reaktion vom Soforttyp



auslösen. Dazu gehören Histamin, Leukotriene, einige Zytokine und Proteasen, und Mediatoren, hauptsächlich Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, deren Expression erst nach der Stimulation initiiert wird. Ihre Freisetzung erfolgt nach Stunden und verursacht so genannte „Late-Phase-Reactions“.

Eine vollständige Darstellung aller von Mastzellen in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen freigesetzten Faktoren in ihrer Mittlerfunktion zu den anderen Zelltypen der Haut ist hier nicht möglich. Erwähnt werden sollte, dass sich das Spektrum der freigesetzten Mediatoren nicht nur während physiologischer und pathologischer Prozesse verändert, die Mastzellen setzen auch, je nach Reifegrad, unterschiedliche Faktoren frei (XII). Während unreifere Vorläuferzellen, wie sie im peripheren Blut zu finden sind, mehr IL-1 und IL-6 freisetzen, exprimieren die Zellen, welche eine Differenzierung Richtung Mastzelle durchlaufen haben, mehr TNF $\alpha$  und IL-3 (XI). Da die Zellen in vivo dabei das Kompartiment vom Blut ins Gewebe wechseln, ist dies als Anpassung an die Bedingungen durch die umgebenden Zellen zu erklären.

Besonders zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass Mastzellen auch den wichtigsten Faktor für ihre Entwicklung und Funktion, SCF, selbst exprimieren können (XIII). Diese Fähigkeit steigt mit zunehmender Reife an (XIII). Die Freisetzung lässt sich durch IgE/Anti-IgE-Stimulation erhöhen. Interessant ist dabei auch, dass die Zellen beide Splice-Varianten des SCF (siehe Kapitel 3) exprimieren können, wobei aber das prozentuale Mengenverhältnis sich im Prozess der Reifung der Mastzelle verändert. Unreife Vorläuferzellen im peripheren Blut exprimieren mehr die membranständige Splicevariante, welche ihnen vielleicht ermöglicht durch Interaktion mit dem Endothel ins Gewebe einzuwandern. Differenzierte Mastzellen setzen eher die lösliche SCF-Splicevariante frei. Das ermöglicht der Zelle in einem autokrinen Mechanismus einen Schutz vor Apoptose und funktionelle Wirkungen auf c-Kit exprimierende Vorläuferzellen. In pathologischen Prozessen mit erhöhten Mastzellzahlen, wie in der Atopischen Dermatitis, Psoriasis oder Urtikaria pigmentosa, sowie in der Wundheilung (starker Anstieg der SCF-Expression, IX), und Tumorangiogenese kann dies zur Akkumulation der Mastzellen im Gewebe führen.

## **5. Modulation der Mediatorfreisetzung als Angriffspunkt für Therapien von chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen**

Die Untersuchung der Mediatorfreisetzung von Mastzellen in der Vergangenheit hat zu erfolgreichen neuen Strategien in der Behandlung von mastzellassozierten Erkrankungen geführt. Dabei gibt es verschiedene Strategien, welche heute verfolgt werden.

- Verringerung der Mastzellzahlen (UV-Bestrahlung)
- Mastzellstabilisierung (z.B. Cromoglycinsäure, Nedocromil),
- Antientzündliche Therapie (z.B. Glukokortikoide, Retinoide),
- Mediator-Antagonisten (z.B. Antihistaminika, Antileukotriene)

Von diesen Methoden wird die Modulation durch UV-Bestrahlung schon am längsten angewendet, da die Beobachtung, dass Sonnenlicht einen günstigen Einfluss auf die Heilung entzündlicher mastzellassoziierter Hauterkrankungen hat, dies schon sehr lange nahe legt. Forschungen der letzten Jahre belegen, dass UV-Bestrahlung selektiv (am effektivsten ist dabei die Behandlung mit UVA1, 157) die Zahl von Mastzellen in der Haut verringern und damit Entzündungsprozesse stoppen kann. Die Wirkungsmechanismen werden zur Zeit von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Die Hemmung der Freisetzung von Zytokinen und damit verringerte Einwanderung von Vorläuferzellen, Apoptoseauslösung und eventuell Abwandern der differenzierten Zellen werden dabei diskutiert (157, 158).

Die Verhinderung der Freisetzung von Mastzellmediatoren durch Stabilisierung der Zellmembran ist ebenso ein schon lange untersuchter und in der Therapie angewendeter Mechanismus (159). Chloridkanäle scheinen eine wichtige Rolle in der Kontrolle sekretorischer Funktionen in Mastzellen zu spielen (160). Diese Kanäle können in Mastzellen durch intrazelluläre Applikation von Cromoglycinsäure (Chromolyn) geblockt werden, was die Vermutung nahe legt, dass es sich um einen spezifischen Blocker von Anionen-Kanälen mittelgroßer Leitfähigkeit handelt (160). Der gleiche Wirkmechanismus wird für das strukturell verwandte Nedocromil beschrieben (161). Für diesen Wirkstoff konnte zusätzlich eine Hemmung der Zytokinfreisetzung aus Makrophagen und T-Zellen gezeigt werden, was einen indirekten inhibitorischen Effekt auf die Mastzellaktivierung auslöst (162, 163).

Mastzellstabilisatoren werden hauptsächlich bei Patienten mit allergischem Asthma eingesetzt.

Auch Glukokortikoide werden schon seit vielen Jahren sehr erfolgreich in der Behandlung mastzellassoziierter Erkrankungen verwendet, wobei der Wirkmechanismus lange Zeit unklar war und bis heute nicht vollständig geklärt ist. Es konnte neben dem Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auch ein Effekt auf die Zytokinfreisetzung der an entzündlichen Reaktionen beteiligten Zellen u.a. auch auf Mastzellen demonstriert werden (164, 165). Dabei werden die Signaltransduktionkaskade, z.B. MAP-Kinasen, und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 inhibiert (166). Auch die Expression von SCF wird direkt (98) oder indirekt (167) durch Glukokortikoide heruntergeregelt, was auf Grund der vielseitigen Wirkungen auf Mastzellen eine sehr effektive Unterbrechung der Entzündungskaskade erzielt.

Durch Behandlung mit Retinoiden ist ebenfalls eine Inhibierung der SCF-Produktion, z.B. aus Keratinozyten nachgewiesen worden (98).

Retinoide und Glukokortikoide haben jedoch auch bei topischer Anwendung zum Teil erhebliche Nebenwirkungen. Für die Kortikoidpräparate werden zwar immer neue Generationen von Präparaten mit immer weniger Nebenwirkungen entwickelt, aber durch neuere Forschungsergebnisse aus dem Labor können auch alternative Wirkmechanismen genutzt werden.

Immunmodulatoren wie Tacrolimus (FK506) und Pimecrolimus (SDZ ASM 981) beeinflussen T-Zell-Aktivierung (168) und Mediatorfreisetzung aus Mastzellen (169) mit besseren Resultaten als Kortikoidpräparate und wesentlich weniger Nebenwirkungen. Sie sind gut topisch in der Behandlung von Atopischer Dermatitis einsetzbar (170).

Verstärktes Augenmerk in der Forschung wird auf die Entwicklung von Antagonisten von Mastzellmediatoren gelegt.

Blocker wurden zunächst für die Histaminrezeptoren H1 und H2 entwickelt (171). Die Nebenwirkungen wie Müdigkeit wurden mit der Entwicklung neuer Generationen verringert. In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass durch diese Wirkstoffe nicht nur die Histaminrezeptoren geblockt, sondern auch die Mediatorfreisetzung aus Mastzellen verringert werden kann (172). Eine exakte Untersuchung der dabei wirkenden Mechanismen wird helfen, noch effizientere Antihistaminika zu entwickeln. Dies trifft auch auf Leukotrienrezeptorantagonisten zu, welche im Moment hauptsächlich in der Behandlung des allergischen Asthmas

zum Einsatz kommen (173). Die Untersuchung weiterer Wirkungen eröffnet die Möglichkeiten der Behandlung anderer mastzellassoziierter Erkrankungen wie der Atopischen Dermatitis (173).

Die Entwicklung von Antagonisten weiterer Mastzellmediatoren, wie Tryptase (174), verschiedener Zytokine (175), und Matrixmetalloproteasen (176) stehen noch am Anfang und werden in Zukunft dazu beitragen die immer häufiger anzutreffenden Erkrankungen des atopischen Formenkreises und anderer mastzellassoziierter Erkrankungen selektiv und effektiv mit möglichst wenig Nebenwirkungen zu behandeln.

## Literaturverzeichnis

1. Taylor ML, Metcalfe DD (2001): Mast cells in allergy and host defense Allergy Asthma Proc 22:115-9
2. Weber S, Krüger-Krasagakes S, Grabbe J, Zuberbier T, Czarnetzki BM (1995) Mast cells. Int J Dermatol 34: 1-10
3. Artuc M, Hermes B, Steckelings MU, Grützkau A, Henz BM (1999) Mast cells and their mediators in wound healing – active participants or innocent bystanders? Exp Dermatol 8: 1-16
4. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA (1997) Mast cells. Physiol Rev 77, 1033
5. Czarnetzki BM, Grabbe J, Kolde G, Krüger-Krasagakes S, **Welker P**, Zuberbier T(1995) Mast cells in the cytokine network: The what, where from and what for. Exp. Dermatol. 4: 221-226
6. Haas N, Toppe E, Henz BM (1998) Microscopic morphology of different types of urticaria Arch Dermatol 1998: 134:41-6
7. Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE. (1997) Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries. J Pathol 182 :115-22
8. Grabbe J, Haas N, Czarnetzki BM (1994) The mast cell. Hautarzt 45:55-63
9. Benyon RC.Clin Mast cells in the liver(1999) Exp Allergy 29:155-8
10. Marone G, Patella V, de Crescenzo G, Granata F, Calabrese C. (2000) Immunological interactions between human eosinophils and cardiac mast cells. Chem Immunol 76:118-33
11. Kurusu A, Suzuki Y, Horikoshi S, Shirato I, Tomino Y.(2001) Relationship between mast cells in the tubulointerstitium and prognosis of patients with IgA nephropathy. Nephron 89:391-7
12. Panula P, Lintunen M, Karlstedt K. (2000) Histamine in brain development and tumors. Semin Cancer Biol 10:11-4
13. Purcell WM, Westgate C, Atterwill CK (1996) Rat brain mast cells. An in vitro paradigm for assessing the toxic effects of therapeutics. Neurotoxicology 17:845-50

14. Moller A, Henz BM, Grutzkau A, Lippert U, Aragane Y, Schwarz T, Kruger-Krasagakes S. (1998) Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunology* 93:289-95
15. Horigome K, Pryor JC, Bullock ED, Johnson EM jr (1993) Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurothrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem* 268: 14881-7
16. Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM (2001) Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1:85-93
17. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Crivellato E, Roncali L, Dammacco F. (2001) The role of mast cells in tumour angiogenesis. *Br J Haematol* 115:514-21
18. Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines (1999) *Crit Rev Oncol Hematol* 31:119-33
19. Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Muller GA, Kuroda Y. (2001) Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis *J Am Soc Nephrol* 12:1668-76
20. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. (2002) The inflammatory response in myocardial infarction *Cardiovasc Res* 53:31-47
21. Kruger PG. (2001) Mast cells and multiple sclerosis: a quantitative analysis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27:275-80
22. McNeil HP, Gotis-Graham I.(2000) Human mast cell subsets--distinct functions in inflammation? *Inflamm Res* 49:3-7
23. Galli SJ, Wedemeyer J, Tsai M. (2002) Analyzing the roles of mast cells and basophils in host defense and other biological responses. *Int J Hematol* 75:363-9
24. Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalf DD (1992) Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ and pluripotent progenitor cells. *J. Immunol.* 148:772-779
25. Czarnetzki BM, Figdor CG, Kolde G, Vroom T, Aalberse R ,de Vries JE (1984) Development of human connective tissue mast cells from purified blood monocytes. *Immunology* 51:549-55
26. Du T, Friend DS, Austen KF, Katz HR. (1996) Tissue-dependent differences in the asynchronous appearance of mast cells in normal mice and in congenic mast cell-deficient mice after infusion of normal bone marrow cells. *Clin Exp Immunol* 103:316-21

27. Grizzi F, Franceschini B, Barbieri B, Gagliano N, Arosio B, Chiriva-Internati M, Annoni G, Dioguardi N. (2002) Mast cell density: a quantitative index of acute liver inflammation. *Anal Quant Cytol Histol* 24: 63-9
28. Inoue T, Yoneda K, Kakurai M, Fujita S, Manabe M, Demitsu T.J (2002) Alteration of mast cell proliferation/apoptosis and expression of stem cell factor in the regression of mastocytoma - report of a case and a serial immunohistochemical study. *Cutan Pathol* 29:305-12
29. Ashman LK. (1999) The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 31:1037-51
30. Matsuda H, Kannan Y, Ushio H, Kiso Y, Kanemoto T, Suzuki H, Kitamura Y.J (1991) Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *Exp Med* 174:7-14
31. Lantz CS, Huff TF (1995) Differential responsiveness of purified mouse c-kit+ mast cells and their progenitors to IL-3 and stem cell factor. *J Immunol* 155:4024-9
32. Kirshenbaum A. (2000) Regulation of mast cell number and function. *Hematol Oncol Clin North Am* 14:497-516
33. Matsushima Y, Ishikawa O, Kurosawa M, Miyachi Y.J (2000) Stem cell factor and IL-6 do not promote complete maturation of human cultured mast cells from umbilical cord blood cells: an ultrastructural study. *Dermatol Sci* 24:4-13
34. Wright SH, Brown J, Knight PA, Thornton EM, Kilshaw PJ, Miller HR. (2002) Transforming growth factor-beta1 mediates coexpression of the integrin subunit alphaE and the chymase mouse mast cell protease-1 during the early differentiation of bone marrow-derived mucosal mast cell homologues. *Clin Exp Allergy* 32:315-24
35. Toru H, Ra C, Nonoyama S, Suzuki K, Yata J, Nakahata T (1996) Induction of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on human mast cells by IL-4. *Int Immunol* 8:1367-73
36. Williams CM, Galli SJ. (2000) The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105:847-59
37. Hjertson M, Sundstrom C, Nilsson K, Nilsson G. (1999) The potential of human mast cell progenitors to differentiate into mature mast cells remains after

- prolonged culture with flt3 ligand, interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Br J Haematol* 104:516-22
38. **Welker P**, Grabbe J, Zuberbier T, Henz BM. (1997) GM-CSF downregulates expression of tryptase, Fc(epsilon)RI(alpha) and histamine in HMC-1 Mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 113:284-86
  39. Kirshenbaum AS, Worobec AS, Davis TA, Goff JP, Semere T, Metcalfe DD. (1998) Inhibition of human mast cell growth and differentiation by interferon gamma-1b. *Exp Hematol* 26:245-51
  40. Zhao ZZ, Sugerman PB, Walsh LJ, Savage NW. (2002) Expression of RANTES and CCR1 in oral lichen planus and association with mast cell migration. *J Oral Pathol Med* 31:158-62
  41. Bochner BS, Schleimer RP (2002) Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol Rev* 2001 179:5-15
  42. Olsson N, Piek E, ten Dijke P, Nilsson G. (2000) Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor-beta family. *J Leukoc Biol* 67:350-6
  43. Nilsson G, Mikovits JA, Metcalfe DD, Taub DD (1999) Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB. *Blood* 93:2791-7
  44. Hartmann K, Henz BM, Kruger-Krasagakes S, Kohl J, Burger R, Guhl S, Haase I, Lippert U, Zuberbier T. (1997) C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* 1997 89:2863-70
  45. Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M (2001) Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 10:1-10
  46. Piliponsky AM, Levi-Schaffer F (2000) Regulation of apoptosis in mast cells. *Apoptosis* 5:435-41
  47. Gommerman JL, Berger SA. (1998) Protection from apoptosis by steel factor but not interleukin-3 is reversed through blockade of calcium influx. *Blood* 91:1891-900
  48. Dror Y, Leaker M, Caruana G, Bernstein A, Freedman MH. (2000) Mastocytosis cells bearing a c-kit activating point mutation are characterized by hypersensitivity to stem cell factor and increased apoptosis. *Br J Haematol* 108:729-36



49. Chung KF. Anti-IgE therapy of asthma. (2002) *Curr Opin Investig Drugs* 3:1157-60
50. Lippert U, Welker P, Kruger-Krasagakes S, Moller A, Henz BM. (1996) Modulation of in vitro cytokine release from human leukemic mast cells (HMC-1) by glucocorticoids *Skin Pharmacol*. 9:93-8
51. Campbell AM, Bousquet J. (1993) Anti-allergic activity of H1 blockers. *Int Arch Allergy Immunol* 101:308-10
52. Balzano G, Fuschillo S, Gaudiosi C. (2002) Leukotriene receptor antagonists in the treatment of asthma: an update. *Allergy* 57 Suppl 72:16-9
53. Denburg JA (1995) Differentiation of human basophils and mast cells, In: *Human basophils and mast cells: Biological aspects* (ed. G. Marone). Chem Immunol, p.49, Karger, Basel
54. Huang S, Terstappen LW (1994) Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood* 83:1515-26
55. Ghannadan M, Baghestanian M, Wimazal F, Eisenmenger M, Latal D, Kargul G, Walchshofer S, Sillaber C, Lechner K, Valent P. (1998) Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies. *J Invest Dermatol* 111:689-95
56. Zuberbier T, Welker P, Grabbe J, Henz BM. (2001) Effect of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in a patient with benign systemic mastocytosis. *Br J Dermatol* 145:661-6
57. Levi-Schaffer F, Austen KF, Gravallesse PM, Stevens RL. (1986) Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6485-8
58. **Welker P**, Grabbe J, Hakimi J, Wall AF, Ostmeier H, Czarnetzki BM ( 1992) Fibroblast-derived factors induce different mast cell characteristics in human myeloid cell lines and peripheral monocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 99: 337-339
59. Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu TY, Buck J, Lahm HW, Wellner D, Leder P, Besmer P.(1990) The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus *Cell* 63:225-33
60. Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P (1988) Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase

- family—oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* 7:1003-11
61. Bischoff SC, Sellge G. (2002) Mast cell hyperplasia: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 127:118-22
  62. Tsuji K, Lyman SD, Sudo T, Clark SC, Ogawa M. (1992) Enhancement of murine hematopoiesis by synergistic interactions between steel factor (ligand for c-kit), interleukin-11, and other early acting factors in culture. *Blood* 79:2855-60
  63. Lowry PA, Deacon D, Whitefield P, McGrath HE, Quesenberry PJ (1992) Stem cell factor induction of in vitro murine hematopoietic colony formation by "subliminal" cytokine combinations: the role of "anchor factors". *Blood* 80:663-9
  64. Andrews RG, Bartelmez SH, Knitter GH, Myerson D, Bernstein ID, Appelbaum FR, Zsebo KM.(1992) A c-kit ligand, recombinant human stem cell factor, mediates reversible expansion of multiple CD34+ colony-forming cell types in blood and marrow of baboons. *Blood*. 80:920-7
  65. Andrews RG, Bensinger WI, Knitter GH, Bartelmez SH, Longin K, Bernstein ID, Appelbaum FR, Zsebo KM. (1992) The ligand for c-kit, stem cell factor, stimulates the circulation of cells that engraft lethally irradiated baboons. *Blood* 80:2715-20
  66. Moore S, McDiarmid LA, Hughes TP (2000) Stem cell factor and chronic myeloid leukemia CD34+ cells. *Leuk Lymphoma* 38:211-20
  67. Lapidot T (2001) Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci* 938:83-95
  68. Sundstrom M, Alfredsson J, Olsson N, Nilsson G. (2001) *Exp Cell Res Jul* 267:144-51.
  69. Galli SJ, Iemura A, Garlick DS, Gamba-Vitalo C, Zsebo KM, Andrews RG. (1993) Reversible expansion of primate mast cell populations in vivo by stem cell factor. *J Clin Invest* 91:148-52
  70. Oliveira SH, Lukacs NW (2001) Stem cell factor and igE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflamm Res* 50:168-74
  71. Dastyh J, Metcalfe DD (1994) Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin.*J Immunol* 152:213-9

72. Karimi K, Redegeld FA, Blom R, Nijkamp FP (2000) Stem cell factor and interleukin-4 increase responsiveness of mast cells to substance P. *Exp Hematol* 28:626-34
73. Brazis P, Queralt M, de Mora F, Ferrer LI, Puigdemont A (2000) Stem cell factor enhances IgE-mediated histamine and TNF-alpha release from dispersed canine cutaneous mast cells. *Vet Immunol Immunopathol* 75:97-108
74. Schmidt-Choudhury A, Meissner J, Seebeck J, Goetzl EJ, Xia M, Galli SJ, Schmidt WE, Schaub J, Wershil BK (1999) Stem cell factor influences neuro-immune interactions: the response of mast cells to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is altered by stem cell factor. *Regul Pept* 83:73-80
75. Wershil BK, Tsai M, Geissler EN, Zsebo KM, Galli SJ (1992) The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces c-kit receptor-dependent mouse mast cell activation in vivo. Evidence that signaling through the c-kit receptor can induce expression of cellular function. *J Exp Med* 175:245-55
76. Iemura A, Tsai M, Ando A, Wershil BK, Galli SJ (1994) The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *Am J Pathol* 144:321-8
77. Büttner C, Henz BM, **Welker P**, Sepp NT, Grabbe J (1998) Identification of activating c-kit Mutations in Adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol* 111:1227-31
78. Hermes B, Feldmann-Böddeker, **Welker P**, Algermissen B, Steckelings MU, Grabbe J, Henz BM (2000) Alteration of mast cell proteases and c-kit in human cutaneous scar Tissue. *J Invest Dermatol* 114:51-55
79. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y (1993) Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *Clin Invest* 92:1736-44
80. **Welker P**, Grabbe J, Czarnetzki BM, (1995) Human Keratinocytes release mast cell differentiation factors other than stem cell factor In *Arch Allergy Immunol* 107:139-141

81. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L (1997) The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunological diseases. *Allergy* 52, 883
82. Marshall JS, Wasserman S (1995) Mast cells and the nerves – potential interactions in the context of chronic disease. *Clin Exp Allergy* 25: 102-110
83. Ulrich A, Gray A, Berman C (1983) Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 303, 821
84. Cartwright M, Mikheev AM, Heinrich G (1994) Expression of neurotrophic genes in human fibroblasts: differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Int J Dev Neurosci* 12, 685
85. Patrick CW jr, Kukreti S, McIntire LV (1996) Quantitative effects of peripheral monocytes and nerve growth factor on CNS neural morphometric outgrowth parameters in vitro. *Exp Neurol* 138, 277
86. Pincelli C, Sevnigani C, Manfredini R, Grande A, Fantini F, Bracci-Laudiero L, Aloe L, Ferrari S, Cossarizza A, Giannetti A (1994) Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103, 13
87. Santambrogio L, Benedetti M, Chao M., Muzaffar R, Kulig K, Gabellini N, Hochwald G. (1993) Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol* 153, 4488
88. Leon A., Buriani A., Dal-Toso R., Fabris M., Romanello S, Aloe L, Levi-Montalcini R (1994) Mast cell synthesize, store and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3739
89. Tam SY, Tsai M, Yamaguchi M, Yano K, Butterfield JH, Galli SJ (1997) Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* 90:1807-20
90. Nilsson G, Forsberg-Nilsson K, Xiang Z, Hallbook F, Nilsson K, Metcalfe DD (1997) Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol* 27:2295-301
91. Urashima R, Mihara M (1998) Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistological and electron microscopic study. *Virchow Arch* 432:363-70
92. Aloe L, Levi-Montalcini R (1997) Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res* 133, 358

93. Kannan Y., Matsuda H., Ushio H., Kawamoto K. & Shimada Y. (1993) Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor. *Int Arch Allergy Immunol* 101, 362
94. Kawamoto K., Okada T., Kannan Y., Ushio H., Matsumoto M. & Matsuda H. (1995) Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the trk proto-oncogene receptor. *Blood* 86, 4638
95. Matsuda H., Kannan Y., Ushio H., Kiso Y., Kanemoto T., Susuki H. & Kitamura Y. (1991) Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med* 174, 7
96. Tal M. and Liberman R. (1997) Local injection of nerve growth factor (NGF) triggers degranulation of mast cells in rat paw. *Neurosci Lett* 221, 129
97. Blennerhassett MG, Bienenstock J (1998) Sympathetic nerve contact causes maturation of mast cells in vitro. *J Neurobiol* 35:173-82
98. **Welker P**, Peckenschneider N, Serowka F, Henz BM, Fischer A (2002): neurotrophins as members of the cytokine network in the skin – role in pathogenesis of Atopic Dermatitis *Arch Derm Res* 294:65
99. Zuberbier T, Lelke A, Sanger K, **Welker P**, Guhl S, Henz BM (2001) Comparison of mast cell precursors and cultured mast cells from the cord blood of children with atopic and nonatopic parents. *Int Arch Allergy Immunol* 124:304-6
100. **Welker P**, Grabbe J, Zuberbier T, Henz BM (1997) GM-CSF downregulates expression of tryptase, FcεRIα and histamine in HMC-1 mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 113:284-286
101. Lopez AF, Elliott MJ, Woodcock J, Vadas MA. (1992) GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross-competition on human haemopoietic cells. *Immunol Today* 13:495-500
102. Okubo T, Yanai N, Watanabe S, Arai K, Obinata M. (2000) Effect of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) on lymphoid and myeloid differentiation of sorted hematopoietic stem cells from hGM-CSF receptor gene transgenic mice. *J Biochem (Tokyo)* 127:591-6
103. Bressler RB, Thompson HL, Keffer JM, Metcalfe DD (1989) Inhibition of the growth of IL-3-dependent mast cells from murine bone marrow by recombinant granulocyte macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol* 143:135-9
104. Du Z, Li Y, Xia H, Irani AM, Schwartz LB. (1997) Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), but not recombinant human granulocyte CSF, down-regulates the recombinant human stem cell factor-

- dependent differentiation of human fetal liver-derived mast cells. *J Immunol* 1997 159:838-45
105. Zuberbier T, **Welker P**, Grabbe J, Henz BM (2001) Effect of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in a patient with benign systemic mastocytosis *Br J Dermatol* 145:661-6
  106. Gabilove JL, Wong G, Bollenbacher E, White K, Kojima S, Wilson EL. (1993) Basic fibroblast growth factor counteracts the suppressive effect of transforming growth factor-beta 1 on human myeloid progenitor cells. *Blood* 81:909-15
  107. Li CY, Baek JY. (2002) Mastocytosis and fibrosis: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 127:123-6
  108. **Welker P**, Foitzik K, Bulfone-Paus S, Henz BM, Paus R. (1997) Hair cycle-dependent changes in the gene expression and protein content of transforming factor beta 1 and beta 3 in murine skin. *Arch Dermatol Res* 289:554-7
  109. Costa JJ, Demetri GD, Harrist TJ, Dvorak AM, Hayes DF, Merica EA, Menchaca DM, Gringeri AJ, Schwartz LB, Galli SJ (1996) Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J Exp Med* 183:2681-6
  110. Scott G, Ewing J, Ryan D, Abboud C. Stem cell factor regulates human melanocyte-matrix interactions. *Pigment Cell Res* 7:44-51
  111. Guo CS, Wehrle-Haller B, Rossi J, Ciment G. (1997) Autocrine regulation of neural crest cell development by steel factor. *Dev Biol* 184:61-9
  112. Flanagan JG, Chan DC, Leder P(1991) Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sld* mutant. *Cell* 64:1025-35
  113. Wehrle-Haller B, Weston JA (1995) Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* 121:731-42
  114. Huang S, Luca M, Gutman M, McConkey DJ, Langley KE, Lyman SD, Bar-Eli M. (1996) Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* 13:2339-47
  115. Schadendorf D, Kohlmus C, Gawlik C, Suter L, Czarnetzki BM (1995) Mast cells in melanocytic tumours *Arch Dermatol Res* 287:452-6

116. Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwarz C, Kogel H, **Welker P**, Lippert U, Henz BM, Moller A (1998) Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell* 9:875-84
117. Nurnberg W, Tobias D, Otto F, Henz BM, Schadendorf D. (1999) Expression of interleukin-8 detected by in situ hybridization correlates with worse prognosis in primary cutaneous melanoma. *J Pathol* 189:546-51
118. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-7
119. Di Girolamo N, Wakefield D (2000). In vitro and in vivo expression of interstitial collagenase/MMP-1 by human mast cells *Dev Immunol* 7:131-42
120. Grabbe J, Kors C, Büttner C, Artuc M, Henz BM, **Welker P** ((1998) Regulation of SCF expression in human keratinocytes by retinoid acid and dexamethason *Arch Derm Res* 290:66
121. Zhao ZZ, Savage NW, Sugerman PB, Walsh LJ 2002 Mast cell/T cell interactions in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 31:189-95
122. Gibbs BF, Wierecky J, **Welker P**, Henz BM, Wolff HH, Grabbe J (2001) Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF- $\alpha$  and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *J Exp Dermatol* 2001 10:312-20
123. Moller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarnetzki BM (1993) Human mast cells produce IL-8. *J Immunol* 151:3261-6
124. Inamura N, Mekori YA, Bhattacharyya SP, Bianchine PJ, Metcalfe DD (1998) Induction and enhancement of Fc( $\epsilon$ )RI-dependent mast cell degranulation following coculture with activated T cells: dependency on ICAM-1- and leukocyte function-associated antigen (LFA)-1-mediated heterotypic aggregation. *J Immunol* 160:4026-33
125. Yoshikawa T, Imada T, Nakakubo H, Nakamura N, Naito K. (2001) Rat mast cell protease-I enhances immunoglobulin E production by mouse B cells stimulated with interleukin-4. *Immunology* 104:333-40

126. **Welker P**, Grabbe J, Zuberbier T, Henz BM. (1999) IgE downmodulates stem cell factor-driven mast cell development from cultured peripheral blood mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* 118:292-4
127. Asai K, Kitaura J, Kawakami Y, Yamagata N, Tsai M, Carbone DP, Liu FT, Galli SJ, Kawakami T. (2001) Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* 14:791-800
128. Rossmann ED, Lewin N, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Mellstedt H (2002) Intracellular T cell cytokines in patients with B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Eur J Haematol* 68:299-306
129. Tachimoto H, Ebisawa M, Hasegawa T, Kashiwabara T, Ra C, Bochner BS, Miura K, Saito H (2000). Reciprocal regulation of cultured human mast cell cytokine production by IL-4 and IFN-gamma. *J Allergy Clin Immunol* 106:141-9
130. Yoshizawa Y, Nomaguchi H, Izaki S, Kitamura K. (2002) Serum cytokine levels in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 27:225-9
131. Bohm I, Bauer R. Th1 cells, Th2 cells and atopic dermatitis *Hautarzt* 1997 48:223-7
132. Moller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarnetzki BM (1993) Human mast cells produce IL-8. *J Immunol* 151:3261-6
133. Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Hershkovich R, Mekori YA (2002) Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *J Immunol* 167:4008-16
134. Toth-Jakatics R, Jimi S, Takebayashi S, Kawamoto N. (2000) Cutaneous malignant melanoma: correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth Hum *Pathol* 31:955-60
135. Erkilic S, Erbagci Z. (2001) The significance of mast cells associated with basal cell carcinoma. *J Dermatol* 28:312-5
136. Calamandrei G, Alleva E (1995) Neuronal growth factors, neurotrophins and memory deficiency. *Behav Brain Res* 66:129-32
137. Purcell WM, Westgate C, Atterwill CK (1996) Rat brain mast cells. An in vitro paradigm for assessing the toxic effects of therapeutics. *Neurotoxicology* 17:845-50



138. Horigome K, Pryor JC, Bullock ED, Johnson EM JR (1993) Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurothrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem* 268: 14881-7
139. Lai KO, Fu WY, Ip FC Ip NY (1998) cloning and expression of a novel neurothrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* 11:64-76
140. Marshall JS, Gauldie L, Nielsen L, Bienenstock J (1993) Leukemia inhibitory factor production by rat mast cells. *Eur J Immunol* 23:2116-20
141. Klein R., Jing S., Venkata N., O'Rourke E. & Barbacid M. (1991) The trk proto-oncogen encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189
142. Leung DY (1999): Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 104 (Suppl), S99-108
143. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC (1998) Neuropeptides in the skin: interactions between neuroendocrine and the skin immun systems. *Exp Dermatol* 7:81-96
144. Luger TA (2002) Neuromediators-a crucial component of the skin immune system. *J Dermatol Sci* 30:87-93
145. Marshall JS, Wasserman S (1995) Mast cells and the nerves – potential interactions in the context of chronic disease. *Clin Exp Allergy* 25: 102-110
146. Osterle LS, Cowen T, Rustin MN (1995) Neuropeptides in the skin of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 20:482-7
147. Skaper SD, Facci L, Romanello S, Leon A (1996) Mast cell activation causes delayed neurodegeneration in mixed hippocampal cultures via the nitric oxide pathway. *J Neurochem* 66:1157-66
148. Janiszewski J, Bienenstock J, Blennerhassett MG (1990) Activation of rat peritoneal mast cells in coculture with sympathetic neurons alters neuronal physiology *Brain Behav Immun.*4:139-50
149. Naukkarinen A, Harvima IT, Aalto ML, Horsmanheimo M (1994) Mast cell tryptase and chymase are potential regulators of neurogenic inflammation in psoriatic skin. *Int J Dermatol* 33:361-6
150. Blennerhassett MG, Bienenstock J (1998) Sympathetic nerve contact causes maturation of mast cells in vitro. *J Neurobiol* 35:173-82
151. Getchell ML, Kulkarni-Narby A, Takami S, Albers KM, Getchell TV (1995) Age-dependent phenotypic switching of mast cells in NGF transgenic mice. *NeuroReport* 6:1261-6

152. Bullock ED, Johnson EM Jr (1996) Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 in mast cells: Potential role in survival promotion. *J Biol Chem* 271, 27500
153. Bruni A., Bignon E., Boarato E, Leon A, Toffano G. (1982) Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat peritoneal mast cells. *FEBS Lett* 138, 190
154. Renauld JC (2001) New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 54:577-89.
155. Yu LC, Perdue MH (2001) Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol Rev* 179:61-73
156. Prue H Hart (2001) Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunology and Cell Biology* 79:149 –155
157. Grabbe J, **Welker P**, Humke S, Grewe M, Schopf E, Henz BM, Krutmann J (1996) High-dose ultraviolet A1 (UVA1), but not UVA/UVB therapy, decreases IgE-binding cells in lesional skin of patients with atopic eczema. *Invest Dermatol* 107:419-22
158. Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK. (2001) Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 79:547-68
159. Cox JS (1971) Disodium cromoglycate. Mode of action and its possible relevance to the clinical use of the drug. *Br J Dis Chest* 65:189-204
160. Reinsprecht M, Pecht I, Schindler H, Romanin C. (1992) Potent block of Cl<sup>-</sup> channels by antiallergic drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 88:957-63
161. Alton EW, Norris AA. (1996) Chloride transport and the actions of nedocromil sodium and cromolyn sodium in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 98(5 Pt 2):S102-5; discussion S105-6
162. Borish L, Williams J, Johnson S, Mascali JJ, Miller R, Rosenwasser LJ (1992) Anti-inflammatory effects of nedocromil sodium: inhibition of alveolar macrophage function. *Clin Exp Allergy* 22:984-90
163. Farrar JR, Rainey DK, Norris AA. (1995) Pharmacologic modulation of Th1 and Th2 cell subsets by nedocromil sodium. *Int Arch Allergy Immunol* 107(1-3):414-5
164. **Welker P**, Lippert U, Nurnberg W, Kruger-Krasagakes S, Moller A, Czarnetzki BM. (1996) Glucocorticoid-induced modulation of cytokine secretion from normal and leukemic human myelomonocytic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 109:110-5

165. Lippert U, **Welker P**, Kruger-Krasagakes S, Moller A, Henz BM. (1996) Modulation of in vitro cytokine release from human leukemic mast cells (HMC-1) by glucocorticoids. *Skin Pharmacol* 9:93-8
166. Kassel O, Sancono A, Kratzschmar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC (2001) Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J* 20:7108-16
167. Da Silva CA, Kassel O, Mathieu E, Massard G, Gasser B, Frossard N (2002) Inhibition by glucocorticoids of the interleukin-1 $\beta$ -enhanced expression of the mast cell growth factor SCF. *Br J Pharmacol* 135:1634-40
168. Reitamo S, Remitz A, Kyllonen H, Saarikko J, Granlund H (2002) Topical noncorticosteroid immunomodulation in the treatment of atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol* 3:381-8
169. Zuberbier T, Chong SU, Grunow K, Guhl S, **Welker P**, Grassberger M, Henz BM (2001) The ascomycin macrolactam pimecrolimus (Elidel, SDZ ASM 981) is a potent inhibitor of mediator release from human dermal mast cells and peripheral blood basophils. *J Allergy Clin Immunol* 108:275-80
170. Cheer SM, Plosker GL (2001) Tacrolimus ointment. A review of its therapeutic potential as a topical therapy in atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol* 2:389-406
171. Baroody FM, Naclerio RM (2000) Antiallergic effects of H1-receptor antagonists. *Allergy* 55 Suppl 64:17-27
172. Lippert U, Moller A, **Welker P**, Artuc M, Henz BM (2000) Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H1- and H2-receptor antagonists. *Exp Dermatol* 9:118-24
173. Chari S, Clark-Loeser L, Shupack J, Washenik K (2002) A role for leukotriene antagonists in atopic dermatitis? *Am J Clin Dermatol* 2:1-6
174. Rice KD, Tanaka RD, Katz BA, Numerof RP, Moore WR (1998) Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases. *Curr Pharm Des* 4:381-96
175. Luger TA (1995) Cytokine treatment of mast-cell-mediated skin diseases. *Exp Dermatol* 4:277-80
176. Kahari VM, Saarialho-Kere U. (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6:199-213

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift